

トキの濾胞刺激ホルモン及び甲状腺刺激ホルモン サブユニットの遺伝子

Follicle-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone
subunit genes in the Japanese crested ibis, *Nipponia nippon*

2003年3月

河崎 大輔

トキの濾胞刺激ホルモン及び甲状腺刺激ホルモン サブユニットの遺伝子

Follicle-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone
subunit genes in the Japanese crested ibis, *Nipponia nippon*

2003年3月

早稲田大学大学院理工学研究科
物理学及応用物理学専攻 分子生物学研究

河崎 大輔

目次

第1章 序論

- 第1節 希少種トキの状況とその繁殖に関連した研究・・・・・・・・・・1
- 第2節 生殖腺刺激ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンサブユニットに
関するこれまでの分子生物学的研究・・・・・・・・・・2
- 第3節 本研究の意義・・・・・・・・・・3

第2章 脳下垂体糖蛋白質ホルモン共通 α サブユニット遺伝子のクローニング

- 第1節 序・・・・・・・・・・5
- 第2節 材料及び方法・・・・・・・・・・5
- 第3節 結果・・・・・・・・・・9
- 第4節 考察・・・・・・・・・・17

第3章 濾胞刺激ホルモン β サブユニット遺伝子のクローニング

- 第1節 序・・・・・・・・・・19
- 第2節 材料及び方法・・・・・・・・・・19
- 第3節 結果・・・・・・・・・・22
- 第4節 考察・・・・・・・・・・32

第4章 甲状腺刺激ホルモン β サブユニット遺伝子のクローニング

- 第1節 序・・・・・・・・・・34
- 第2節 材料及び方法・・・・・・・・・・34

第3節	結果	38
第4節	考察	48
第5章 濾胞刺激ホルモンβサブユニット遺伝子のイントロンの解析		
第1節	序	51
第2節	材料及び方法	51
第3節	結果	54
第4節	考察	59
第6章 総括		
		61
謝辞		63
参考文献		64

第 1 章

序 論

第1節 希少種トキの状況とその繁殖に関連した研究

トキ（学名 *Nipponia nippon*）はコウノトリ目トキ科に属する絶滅のおそれのある鳥類である。この鳥はかつて日本、朝鮮半島、中国、ロシア南東部に広く分布していたが、19世紀後半から20世紀前半にかけて激減し、1980年代には朝鮮半島とロシアの個体群は絶滅してしまった（図1-1）。日本では、1981年に佐渡島に残っていた最後の野生個体5羽を捕獲し、1968年にすでに捕獲されていた雌の「キン」とともに飼育下での繁殖が試みられたが不成功に終わり、1995年に雄の「ミドリ」が死亡して以来、日本産のトキは「キン」1羽が生き残っているのみである。一方、中国では、トキは一時絶滅したものと考えられていたが、1981年に陝西省洋県で2つがいが発見されて以来、その数を増やしており、2002年現在、野生個体群は約170羽、飼育下でも約160羽にまで増えている。近年、佐渡島のトキ保護センターでも中国より贈られたトキが順調に繁殖している。

1980年代、日本で飼育下での繁殖が試みられていた頃、希少鳥類への応用を最終目標として、生殖腺刺激ホルモン投与による産卵誘起の研究が行われた。その結果、Wakabayashi *et al.* (1992) は短日条件下で飼育し性的に未成熟に保ったウズラの雌にニワトリの脳下垂体抽出物を投与することにより、生殖腺の発達及び産卵を誘起することに成功した。さらに、こうして産卵された卵から孵った個体が生殖可能なことも確認された（Ishii, 1999）。この手法がトキに応用されることはなかったが、トキを含む希少鳥類にこのような方法を応用することが可能であることが実験的に示されたのである。

第2節 生殖腺刺激ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンサブユニットに関するこれまでの分子生物学的研究

多くの脊椎動物において、濾胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone: FSH) と黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH) の2種類の生殖腺刺激ホルモンと甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone: TSH) は、いずれも脳下垂体で合成、分泌され、共通する分子構造を持つため、脳下垂体糖蛋白質ホルモンと総称される。その分子構造は α と β のサブユニット1つずつからなるヘテロダイマーであるが、 α サブユニットはこれらのホルモンで共通であるのに対し、 β サブユニットはそれぞれのホルモンに固有の構造である。FSH β 、LH β 、TSH β サブユニットは部分的に共通するアミノ酸配列を持つため、共通の祖先分子から進化したものと考えられている (Ishii, 1991)。これまで、それぞれのサブユニット遺伝子のクローニングは哺乳類と魚類でしか報告されていなかった (5、19、34 ページ参照)。

鳥類においては、これらのサブユニット分子の cDNA の配列やアミノ酸配列が報告されているが、それはニワトリ、ウズラ、シチメンチョウといったキジ目とアヒル、ダチョウという限られた種のみであった (5、19、34 ページ参照)。系統分類学的には、原生の鳥類は古口顎類 (ダチョウ目、シギダチョウ目) と新口顎類に大別され、さらに新口顎類はキジ目とカモ目を含む分岐群と、それ以外のすべての目を含む分岐群に二分される (由利, 2002)。したがって、新口顎類の第二の分岐群に属する種については、これらのサブユニット分子の塩基配列やアミノ酸配列は明らかにされていなかった。鳥類の多くの種が含まれるこの分岐群に属する種でこれらのサブユニット分子の配列の情報を得ることは、鳥類におけるこれらの分子の進化を探る上で必要不可欠のことである。

第3節 本研究の意義

以上のことから、トキの生殖腺刺激ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンサブユニットの遺伝子のクローニングは、鳥類で初めてこれらの遺伝子の構造を明らかにし、脊椎動物におけるこれらの遺伝子の進化を考えるという点からも、鳥類において新口顎類の第2の分岐群に属する種では初めてこれらの分子の情報を得て、鳥類におけるこれらの分子の進化を考えるという点からも、また、組換え生殖腺刺激ホルモンの作製を可能とし、これを投与することにより、この希少種の人工繁殖に貢献するという点からも、重要な研究であると考えられる。本研究では、共通 α 、FSH β 、TSH β サブユニットの遺伝子のクローニングを行ったので、それぞれについて第2章、3章、4章で述べる。

また、この種について個体ごとに遺伝的な情報を得ることは、この希少種の保護上、あるいはこの種の地理的分布と遺伝的変異の関係を知る上で重要である。この観点から、FSH β 遺伝子のイントロンの1つについて個体ごとに調べた。これについて第5章で述べる。

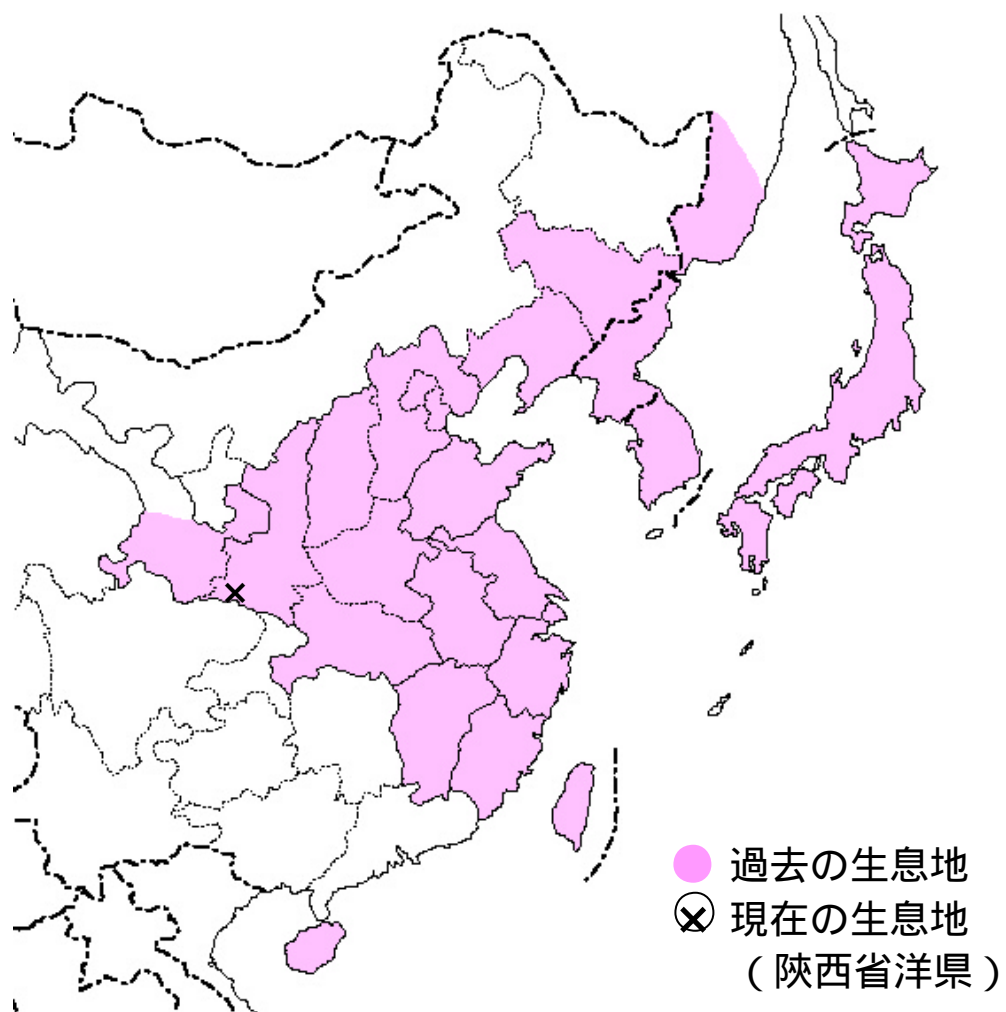


図1-1. 過去と現在のトキの生息地（安田, 1983より著者改変）

第 2 章

脳下垂体糖蛋白質ホルモン共通 サブユニット遺伝子のクローニング

第1節 序

脳下垂体糖蛋白質ホルモン共通 α サブユニット遺伝子（以降「共通 α 遺伝子」と略）のクローニングは、まずヒトで報告され（Fiddes & Goodman, 1981）その後、ウシ（Goodwin *et al.*, 1983）ラット（Burnside *et al.*, 1988）マウス（Gordon *et al.*, 1988）ブタ（Kato *et al.*, 1990）アカゲザル（Golos *et al.*, 1991）といった哺乳類で、次いでコイ（Huang *et al.*, 1992）サケ（Suzuki *et al.*, 1995）といった魚類で報告されてきた。鳥類においては、cDNA クローニングがシチメンチョウ（Foster & Foster, 1991）ニワトリ（Foster *et al.*, 1992）ウズラ（Ando & Ishii, 1994）アヒル2種（Hsieh *et al.*, 2001）で報告されている他、化学的手法によって決定された蛋白質のアミノ酸配列がダチョウで報告されている（Koide *et al.*, 1996）。本章では、クローニングにより明らかにされたトキの共通 α 遺伝子の構造と推測されるアミノ酸配列について述べる。

第2節 材料及び方法

材料

トキ（*Nipponia nippon*）

1995 年に日本産最後の雄「ミドリ」が死亡した際、早稲田大学教育学部の石居進教授（当時）を始めとする「遺伝子保存研究班」のメンバーが、その組織を凍結保存した（Ishii, 1999）。その組織のうち腎臓の一部を用いた。

方法

1) サザンブロット解析

液体窒素中で保存されていた「ミドリ」の腎臓の一部より、約 15mg を取り出し、GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Bioscience) を用いてゲノム DNA を抽出した。この DNA 1 μ g ずつを制限酵素 *Eco*RI または *Bam*HI で消化し、アガロースゲル電気泳動を行った。このゲルをエチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下で写真撮影した後、0.5M NaOH, 1.5M NaCl 中で 20 分間振とうすることでアルカリ変性を行い、1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH8.0) 中で 20 分間の振とうを 2 回行うことで中和した。その後、この DNA をナイロン膜 (Nytran; Schleicher & Schell) に転写し、UV 照射により DNA を固定した。このナイロン膜を、熱変性 (95 $^{\circ}$ C、3 分) したサケ精子 DNA (0.2 mg/ml) を含むハイブリダイゼーションバッファー中で 42 $^{\circ}$ C、2 時間振とうすることでプレハイブリダイゼーションを行った。なお、ハイブリダイゼーションバッファーの組成は以下の通りである。

*ハイブリダイゼーションバッファー

6xSSC

1xSSC: 150mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH7.0

Denhardt 溶液

0.02% Ficoll, 0.02% bovine serum albumin (BSA),

0.02% polyvinylpyrrolidone

0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)

プレハイブリダイゼーション後、バッファーを入れ替え、プローブを加えて 55 $^{\circ}$ C で

一晩、ハイブリダイゼーションを行った。プローブは、ウズラ共通 α サブユニット cDNA (pQA312; Ando & Ishii, 1994) を *rediprime* DNA labelling system (Amersham Bioscience) を用いてランダムプライム法により [α - 32 P]dCTP で標識し、ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Bioscience) で精製したものを用いた。ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 3xSSC, 0.1%SDS 中ですすぎ、次いで 1xSSC, 0.1%SDS 中で 60 、20 分間の洗浄を 3 回行った。その後、BAS-2000II Bio-Imaging Analyzer (富士フイルム) のイメージングプレートに一晩露光し、BAStation (富士フイルム) でポジティブシグナルの解析を行った。

2) ゲノムライブラリーの作製

サザンブロット解析の結果、*Eco*RI 消化した DNA のレーンでおよそ 5kb の位置に 1 本のシグナルのバンドが観察された。この断片をクローニングするため、*Eco*RI 消化した DNA と λ ZAPII ベクター (Stratagene) を用いてゲノムライブラリーを作製した。ゲノム DNA を *Eco*RI で完全消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、4-10kb の断片を切り出して、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製した。回収した DNA のうち約 0.5 μ g を DNA Ligation Kit Ver.1 (Takara) を用いて λ ZAPII ベクター 1 μ g にライゲーションし、その反応液 10 μ l 中 4 μ l を Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) を用いてパッケージングした。その結果、 2.5×10^5 pfu のライブラリーが得られたが、これを 1.3×10^{11} pfu まで増幅し、そのうちの 2.5×10^5 pfu についてスクリーニングを行った。

3) スクリーニング

スクリーニングはプラークハイブリダイゼーション法により行った。直径 150mm の

LB プレート 1 枚につき 5.0×10^4 pfu のクローンを捲き、ナイロン膜 (Hybond N+; Amersham Bioscience) に転写、アルカリ変性、中和後、UV 照射により DNA を固定した。このナイロン膜を 2xSSC 中で煮沸してトップアガーを除去した後、前述のようにプレハイブリダイゼーションを行った。その後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識したウズラ共通 αcDNA をプローブに用い、55 で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションの後、ナイロン膜を 1xSSC, 0.1%SDS 中ですすぎ、次いで 1xSSC, 0.1%SDS 中で 60 、20 分間振とうしながら洗浄した。最後に室温の 1xSSC ですすいだ後、前述のようにポジティブシグナルの解析を行った。

第 2、第 3 スクリーニングは、第 1 スクリーニングと同じ条件で行った。単離したクローンについては、Predigested $\lambda\text{ZAPII}/\text{EcoRI}/\text{CIAP}$ Cloning Kit (Stratagene) のマニュアルに従い、プラスミドベクター pBluescript へのサブクロニングを行った。

4) シークエンシング

得られた 10 個のクローン (pIA1 ~ pIA10) を制限酵素処理により解析した結果、このうち 7 個 (pIA1,2,3,4,5,7,9) は同一のインサートをもつと結論されたので、そのうちの 1 つ (pIA1) の塩基配列を決定した。Deletion Kit for Sequencing (Takara) を用い、このクローンのデレーションミュータントを作製、シークエンシングを行った。シークエンシング反応には Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit(USB)を用い、LI-COR 社製のオートシークエンサー dNA Sequencer Model 4000L で解析を行った。

なお、pIA6, 8, 10 は、インサート DNA に対し、ウズラ共通 αcDNA をプローブに用いてサザンブロット解析を行った結果、シグナルが得られなかったため、共通 α サブユニットをコードしたものではないと判断し、シークエンシングは行わなかった。

第3節 結果

図 2-1 に pIA1 の塩基配列を決定した際のシーケンシング戦略を示した。このシーケンシングの結果、5,026bp の塩基配列を決定した。これをウズラ共通 α cDNA(pQA312; Ando & Ishii, 1994) と比較した結果、相同性の高い部分が見つかったため、この配列はトキ共通 α サブユニットをコードしているものと仮定し、ウズラ共通 α cDNA との相同性をもとにエクソン-イントロン構造を推定した。エクソンとイントロンの境界は gt-ag ルール (Breathnach & Chambon, 1981) に従って決定した (図 2-2)。その結果、この配列中には 3 つのエクソンが存在し、これらのエクソンには 5' 非翻訳領域の一部 (7bp) と翻訳領域、3' 非翻訳領域のすべてが含まれることが明らかになった。しかし、5' 非翻訳領域の残りの部分に相当する配列は見つけることはできなかった。アミノ酸配列を推測し、ウズラの共通 α サブユニットと比較した結果、97.5%の相同性が見られたことから、得られた塩基配列はトキの共通 α サブユニットをコードするものであると結論した。

推測したエクソン-イントロン構造を、既に報告されている魚類や哺乳類の共通 α 遺伝子と比較した (図 2-3)。既知の共通 α 遺伝子はいずれも 4 つのエクソンからなっており、第 1 イントロンは 5' 非翻訳領域の間に、第 2、第 3 イントロンは翻訳領域の間に位置していることが共通している。比較の結果、トキで得られた部分は、既知のものの第 1 イントロンから 3' 側の部分に相当する部分であると判明した。翻訳領域の間にあるイントロンの位置をアミノ酸配列のアライメントをとることで比較した結果 (図 2-4)、トキの第 2 イントロンの位置は哺乳類と同じであるが、魚類のものとは 1 アミノ残基分ずれていることが明らかになった。一方、第 3 イントロンは魚類、トキ、哺乳類を通じて同じ位置であった。

アミノ酸配列を他の鳥類と比較した結果 (図 2-5)、シグナルペプチド部分ではアヒルや

キジ目（ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ）と 24 アミノ酸残基中 3 残基が異なっていたが、成熟蛋白質部分 96 残基についてはこれらの鳥類と完全に同じであり、ダチョウとも 3 残基が異なるだけであることが明らかになった。なお、シグナルペプチドと成熟蛋白質との境界は SignalP v2.0 (Nielsen *et al.*, 1997; Nielsen and Krogh, 1998) により推定した。

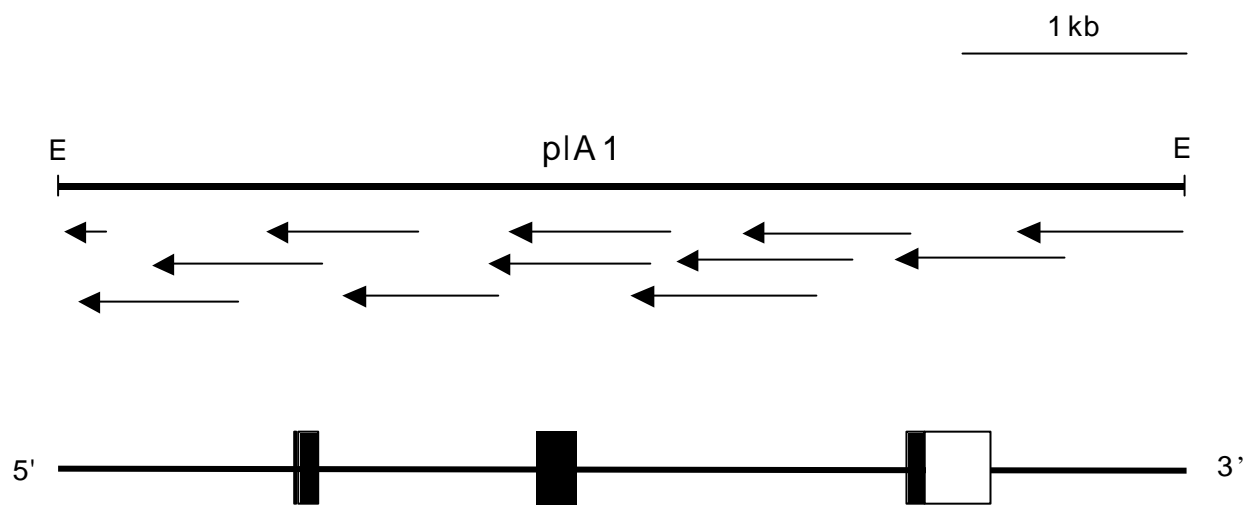


図2-1. トキの共通 α サブユニット遺伝子の部分的なエクソン-イントロン構造とシーケンシング戦略

上段にpIA1のインサート部分を示した。「E」はEcoRIサイトを、下の矢印はシーケンシングの方向と範囲を示す。

下段には推測されるエクソン-イントロン構造を示した。ボックスはエクソンを表し、黒い部分は翻訳領域を、白抜きの部分は非翻訳領域を表す。また、実線の部分はイントロンまたは3'下流域を表す。

```

gaattcatttttttaaaaaatcaggcaagaatttgggacaatatctgtacagttgcaatttacatattctgcatctttaatgttggttc
ccccagttattcatatcagagatacgcgttaccccttgatctggatcaaataatagccacacaactgcatttctgttgaaataccagaga
acatgcaatatgtctatttaccggccacttcatctgtgagctagcagtagaaggatggatgtgcagtgctgcatgtagcctcttttcacaa
aattaatctattgaaaaaatttgtaaaagtttgagctgactgggggtgtgtttgtaccagcacccaaaagtcaattatttctgcatcag
gaaaaatgaagcctgaaagaaatcttgggtccagaaggctgcagagatgctgaactcccaggaccacctgacctgagctgcccctgacga
ggcctccatgcgatgcaggtggccccagggtgtttcaagccctctgagctctctctcagcaccgtgtcccctcggtgtctgtggagca
cagcatatagtgctgtcttaattacaagggcagaggagcttttgcccactgagggacaggactgggaaaatctgtttatggggactttg
atgctaaagacgtcagtggtgaacaaataatctgactcttgggttcaggaaattatgtcctgatgtgaaattattccccttaaattagt
cttttcatggctcagattctgcagattctctcatcctcccataagcatttggctggctttatccagctctaccgtaaatattaggcagttat
gacgtttgaagtttatgtgctgtggtttatgttaattattcagaaaaaactgttaaggccagaaagaaaggcacaattttgttatagtgtg
gaagtcaattttctgagcctataaaaatgcacatcagtcactgcattttcattttctaatcctggttctaaattgtctctgttacttgcg
ctgaatgctctatcagtggtgtagcctagatgctggtagtaccgaatgcagaaacagtccttaaaaatgtattttgtattttccagA
AAGATC ATG GGT TGC TAC GGG AAG TAT GCA GCT GTC ACT TTG ACC ATT TTG TCT GTA TTT CTG CAT CTT
Met Gly Cys Tyr Gly Lys Tyr Ala Ala Val Thr Leu Thr Ile Leu Ser Val Phe Leu His Leu
-20 -10
CTT CAT GCT TTC CCA GAT GGA GAG TTT CTC ATG CAG Ggtaagctgctttcagcattcagaaatagggcaattgttcgt
Leu His Ala Phe Pro Asp Gly Glu Phe Leu Met Gln
+1 +9
aaagagtattaattaaaaatttcacatgttttataaatgcagtcataaatcttatcattcagttgcattttattgacactgagatatgaagg
tataataaatcaaggtaattttgtctataaatataacttctattttctctctctaaacttgatttctccaggtcaagagcctcacagatgact
gtgtcctcatgttgacatgggtaaccttaatccttgaaacattatcaaatagaaacattttgggttcttgatttctgagatctaaatgg
caacgtaacatcaggaccagcagaaccatagcttctcctcataatgcagaaaaatttgcctctgtagatccagaaatagggatgttg
gtggtgtagcattctacgaaagaagcatattaggaagattttaggggtgttttggaggttgcgttttgttttttttaattcagcctcg
aactgaatgtagaaaaatgtgagctacaaaaatctcgggatcactgggcatttttaaaacttgataacagagcttgcctgaaaacagac
aatgtttaagaacacactacaagtcctgtggtgttattttaaccatctgtagtaggaagttttctagggacagctagtgtgtagagac
atacaaaaaaagcctcccaactgtcaacaaaattaaagtttagaaaaaccagaaaagatacaatgatgctcgctgacctaccctagaaagcc
acctctagttttacagacgggtgcatgttgcagggttgaaggaccccaagaggagagctttgtgtctgtgcttttctgttctgcagggc
atcaagcagcaaaaatgtggccagtgcttctcttactgcccgcactttccctttctttatgaaaaatgaaaatacagctggagaccaagt
aaaaggttcttctcttatatttttatgtgcag GT TGT CCA GAG TGC AAG CTA GGG GAG AAC AGA TTC TTT TCC AAG
Gly Cys Pro Glu Cys Lys Leu Gly Glu Asn Arg Phe Phe Ser Lys
+10 +20
CCA GGA GCC CCC ATT TAC CAG TGC ACT GGG TGC TGT TTC TCC CGG GCC TAT CCC ACT CCG ATG AGG
Pro Gly Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Thr Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro Met Arg
+30 +40
TCC AAG AAG ACC ATG CTC GTT CCA AAG AAC ATT ACA TCA GAA GCA ACG TGC TGC GTA GCA AAG GCT
Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala
+50 +60
TTT ACC AAG gtgaggtgtgaatgagacccgtttaagcttgtttcaggatgcaatgttttagctgagccagtgaacagaaaaaatat
Phe Thr Lys
+70
gtttttgtgaggagacattggagaactatttgagggaacatccttggcatttatatcctttgtcttgggttctttctttttctaaaga
ggaaattaaaatgtcagccagtagtctgatattcagttgggatgtggaaattgatgcactgtcactgacttcagtgaaactacttt
gactcatgacacctgaagtctctgggtgatggacttgttgtcccttgttttttagctctcctggatagtcaccctccctttaaattgctatgc
agtgtgtattttgatttttaattagtcattttccttgtgtctttcctgcataggcagaagttctctgggaaggtggctgggtcaatactatca
attacatgtatgggaatgagggacaaaaaccatctgtgctcattagattaattgaggttgtgtttacttttaattagatataaccaagaggg
aactgtaaaatgtgtgcaactatttgagcatttaattgctctcatctggaaggctctcttaagagagattctgtctaaagctgactgttttg
ggagtgtattcagctccaggtgaacaaaaccttaattttcattgaataaatggtagctagttgaaacaagctaaggtgtctatcctgtggt
gatctgaatcagactcattaaatgtgttgactagaggctcaggtcagttaccactcacagatttgggtgccatatgaaataacctgggggt
actcaagacatctgtgttcggctggcagacacaggaccataaaaagaccttctggaatggtagctggaggcttgggtgggacccctctga
tatctcaaatggcagttgacagctctgtgtgcgcagctgaacaaagtgtgggtctccactggctgtgatgagagcccaggtacctgact
tacctatagacacctacagctgaacctggctgaacctggctcttcatctgagtagggcatagattctttttctagaccactgacattat
actgcccctgaggcagcaactagaatttgggtgagattaaaaataaaatgactcatcgtgtttgtggtctctgtttttataatcgccgt
gtgaaaaactctaagaacacttctgatttttcatagattggttacttgacactttttgaatatcagacactttaagaagtgcacaaatta
aggacacaaaactatgtcgcttttgaaaaactttctctttatggctctgaaagccactgatgatgcagcctcgaggttggcgttcagagg
ctgttctagtatacgtacccacagagcctgtgtaccttatgggttaagaaaaaggcttcagacatcttttactcgagaatgctgttttta
ctgtctagctaatacctaattattttctatgtgtgtgtgttttctttctttaag ATT ACC CTT AAG GAC AAT GTG AAG ATA
Ile Thr Leu Lys Asp Asn Val Lys Ile
+72 +80
GAG AAC CAT ACA GAT TGT CAC TGC AGT ACC TGC TAC TAT CAT AAA TCC TAA AGCCTGTCCCTTTGTTAATGAT
Glu Asn His Thr Asp Cys His Cys Ser Thr Cys Tyr Tyr His Lys Ser stop
+90 +96
CAAGGACAACGGTGAATGGAATATTTGTTTTTCAGCTTTTATAGCACTGCTGTGTAAAAATCTTATGTTTTCTGATCAAGACACTGGGTAG
ACCTTTGAATAAAGATGGATGGCTGTTTTATTTCTCTTTGCTTCTTCATGCGTTAAGTAAGTTAATTATTTCCATTAGGGATAAAATA
CAGCACTTGCATGACAACCGAAGGCTTGATCTATTTTTAAATAAATCTGTCAGTTAAATCATCaatgtttcttgaggaaaaatgattatt

```

図2-2. (次ページに続く)

taatagcttaaaacagaaaaagattctgctgcagttaatttctagatttctttttttgtgggagagggaggggaaggaggaagggagggga
 tgggaaagtggatagaaaaagaagcaatcatttccccttattcatttagtgattagattttttgaagactcaacattttgtttctcctg
 tttctcttcggttttttctttaccttgtaggcagaaagttaacagtgtatcatctatgcacagtgcctctgtccttctgtgccatctttt
 atttttctttgaacttaattctcctctcatatagatacataaatggatgcagaatcagacctataaaaaattgtacagtttggtgtagca
 gtggtaggctagaggagtgtacaacaatattagctatttaaggtgtgcttgagcagcatggtatagggttttagtaattccaaataaa
 caaatgggaaaggtaaggaatatgttcctggggaacaggctgcccagggaagtggttgagtcacctccctggaggtatttaaagactt
 gtagatatggtgcttagggacatggtttagtggtggacttggcagtgctagggttaatggttgggctggatgatcttaaaggtctttcca
 acctaaatgattctgtgattctgtgattctatgttaggtgagaagtggaccacagagtatgtattcagaatacatgaccttaatatcata
 aactgggatttttagagatagcacttgttcaattgtagtggttggatcggggactctggaggaactgcttgaggtctggaacccgctca
 tgggaaccgaagtgaaggaattc

図2-2. トキの共通 α サブユニット遺伝子の部分的な塩基配列

エクソン部分の塩基配列を大文字で、イントロン、3' 下流域の部分の塩基配列を小文字で表した。ポリA付加シグナル「AATAAA」には下線を引いた。推測されるアミノ酸配列を塩基配列の下に示し、成熟蛋白質のアミノ末端を+1として順に番号を付けた。

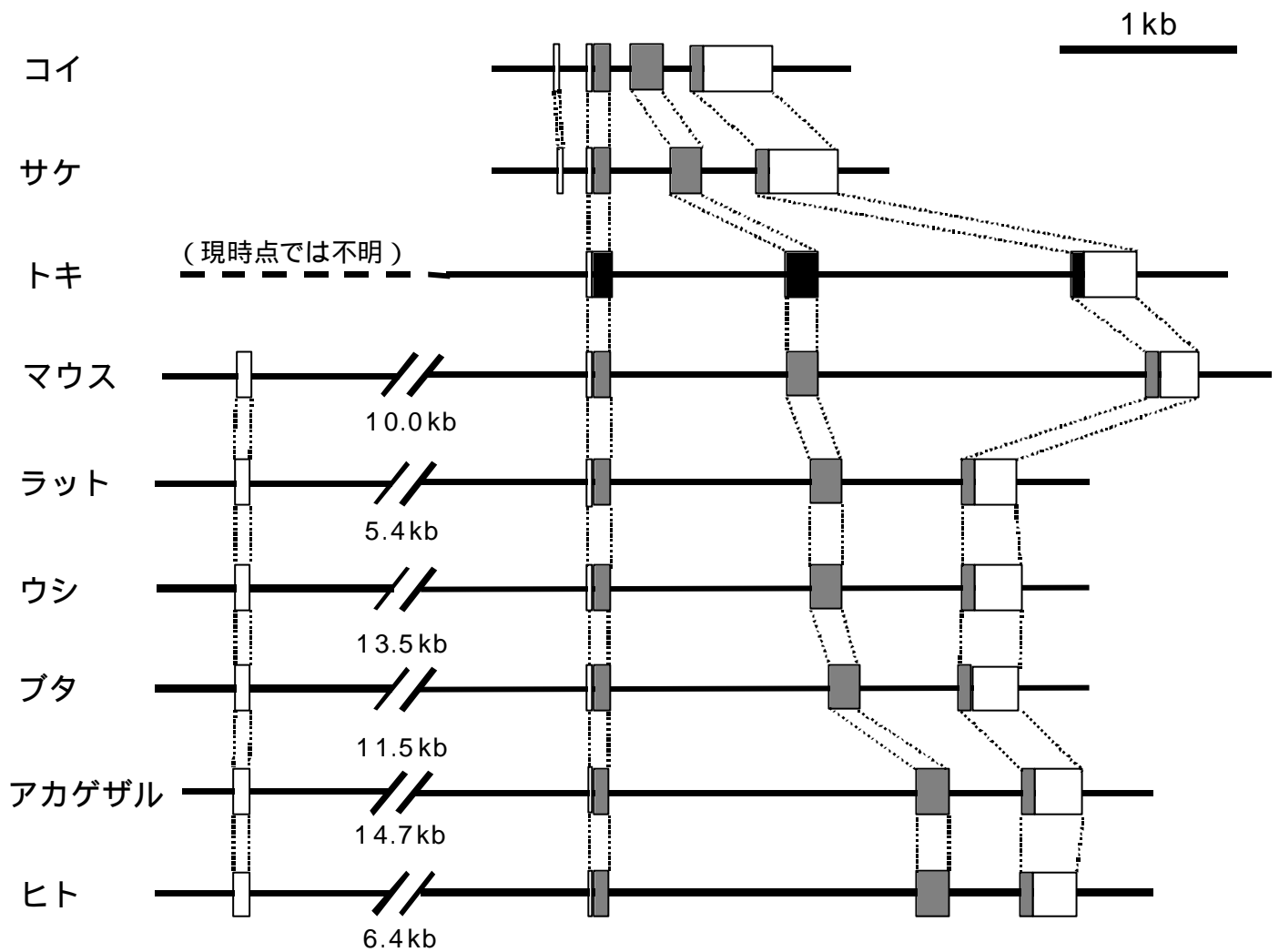


図2-3. 魚類、トキ、哺乳類の共通 α サブユニット遺伝子のエクソン-イントロン構造の比較

ボックスはエクソンを表し、塗りつぶした部分は翻訳領域を、白抜きの部分は非翻訳領域を表す。実線は5'上流域、イントロン、3'下流域を表す。対応するエクソンを破線で結んだ。

参考文献

コイ (Huang *et al.*, 1992)、サケ (Suzuki *et al.*, 1995)、マウス (Gordon *et al.*, 1988)、ラット (Burnside *et al.*, 1988)、ウシ (Goodwin *et al.*, 1983)、ブタ (Kato *et al.*, 1990)、アカゲザル (Golos *et al.*, 1991)、ヒト (Fiddes & Goodman, 1981)

(A)	+1		+36
コイ	YPRNDMNN	FGCEECKLKENNIFSKPGAPVYQCMGCC	
サケ	YPNSDKTN	MGCEECTLKPNTIFPN----	IMQCTGCC
トキ	FPDGEFLMQ	GCPECKLGENRFFSKPGAPIYQCTGCC	
ラット	LPDGDLIIQ	GCPECKLKENKYFSKLGAPIYQCMGCC	
マウス	LPDGDFIIQ	GCPECKLKENKYFSKLGAPIYQCMGCC	
ウシ	FPDGEFTMQ	GCPECKLKENKYFSKPDAPIYQCMGCC	
ブタ	FPDGEFTMQ	GCPECKLKENKYFSKLGAPIYQCMGCC	
アカゲザル	FPDGEFTMQ	DCPECKPRENKFFSKPGAPIYQCMGCC	
ヒト	APD----	VQ DCPECTLQENPFFSQPGAPILQCMGCC	

(B)	+56		+96
コイ	NITSEATCCVAKEVKR	VLVNDVKLV-NHTDCHCSTCYHKS	
サケ	NITSEATCCVAKEGER	VTTKDGFVPTNHTECHCSTCYHKS	
トキ	NITSEATCCVAKAFTK	ITLKDENVKIENHTDCHCSTCYHKS	
ラット	NITSEATCCVAKSFTK	ATVMGNARVENHTDCHCSTCYHKS	
マウス	NITSEATCCVAKAFTK	ATVMGNARVENHTECHCSTCYHKS	
ウシ	NITSEATCCVAKAFTK	ATVMGNVRVENHTECHCSTCYHKS	
ブタ	NITSEATCCVAKAFTK	ATVMGNARVENHTECHCSTCYHKS	
アカゲザル	NVTSESTCCVAKSLTR	VMVMGSRVENHTECHCSTCYHKF	
ヒト	NVTSESTCCVAKSYNR	VTVMGGFKVENHTACHCSTCYHKS	

図2-4. 魚類、トキ、哺乳類の共通 α サブユニット遺伝子のイントロンの位置の比較

(A) 第2イントロン (B) 第3イントロン

矢印とスペースでイントロンの位置を示した。アミノ酸配列の上の数字は、トキの成熟蛋白質のアミノ末端を+1とした場合のアミノ酸の位置を表す。

参考文献

コイ (Huang *et al.*, 1992)、サケ (Suzuki *et al.*, 1995)、ラット (Burnside *et al.*, 1988)、マウス (Gordon *et al.*, 1988)、ウシ (Goodwin *et al.*, 1983)、ブタ (Kato *et al.*, 1990)、アカゲザル (Golos *et al.*, 1991)、ヒト (Fiddes & Goodman, 1981)

(A)

	-24	-1
トキ	MGCYGKYAAVTLTILSVFLHLLHA	
アヒル	.D..R.....S	
ニワトリ	.D..R.....T	
ウズラ	.D..R.....T	
シチメンチョウ	.D..R.....T	

(B)

	+1	+32
トキ	FPDGEFLMQGCPECKLGENRFFSKPGAPIYQC	
アヒル	
ニワトリ	
ウズラ	
シチメンチョウ	
ダチョウV...	
	+33	+64
トキ	TGCCFSRAYPTPMRSKKTMLVPKNITSEATCC	
アヒル	
ニワトリ	
ウズラ	
シチメンチョウ	
ダチョウL.....	
	+65	+96
トキ	VAKAFTKITLKDENVKIEHNHTDCHCSTCYHKS	
アヒル	
ニワトリ	
ウズラ	
シチメンチョウ	
ダチョウE.....	

図2-5. 鳥類における共通 α サブユニットのアミノ酸配列の比較

(A) シグナルペプチド部分 (B) 成熟蛋白質部分

トキ以外の鳥類では、トキと同じアミノ酸残基を「.」で示した。システイン残基を「C」で、糖鎖が付加すると推測されるアスパラギン残基を「N」で示した。

参考文献

アヒル (Hsieh *et al.*, 2001)、ニワトリ (Foster *et al.*, 1992)、ウズラ (Ando & Ishii, 1994)、シチメンチョウ (Foster & Foster, 1991)、ダチョウ (Koide *et al.*, 1996)

第4節 考察

本研究では、トキの共通 α 遺伝子の部分構造を明らかにした。この遺伝子の構造を明らかにしたのは鳥類では初めてのことである。トキで得た部分的なエクソン-イントロン構造を既知の動物（哺乳類、魚類）と比較したところ、ほぼ同じ構造をしていることが明らかになった（図 2-3、図 2-4）。魚類や哺乳類と同じ構造がトキでも見られたことから、トキ以外の鳥類でもこの構造が保存されているものと考えられる。

唯一の違いが見られたのは第 2 イントロンの位置で、トキと哺乳類では同じ位置であったが、魚類（条鰭類）では 1 アミノ酸残基分ずれた位置にあった（図 2-4）。条鰭類の共通 α サブユニットについては、新井(1999)が様々な脊椎動物のアミノ酸配列の比較から、他の脊椎動物に比べて進化速度が特に大きくなっていると報告している。したがって、このイントロンの位置の変化がトキ（鳥類）と哺乳類の共通祖先で起こった可能性に加え、魚類（条鰭類）の祖先で起こった可能性、あるいは両方で起こった可能性も考慮に入れなければならない。Arai *et al.* (1998) は様々な脊椎動物の共通 α サブユニットのアミノ酸配列のアライメントをとり、その中でオーストラリアハイギョだけがこのイントロンが位置すると考えられる箇所に 1 アミノ酸残基の挿入を持つことを報告している。オーストラリアハイギョの共通 α 遺伝子の構造は現在のところ明らかにされていないが、これが明らかにされれば、このイントロンの位置の違いを説明する情報が得られる可能性がある。

また、鳥類内でアミノ酸配列を比較した結果、トキ、アヒル、キジ目（ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ）、ダチョウのアミノ酸配列は、立体構造を構築するのに重要なシステイン残基や、糖鎖が付加すると推測されるアスパラギン残基などの特徴的なアミノ酸残基も含めて全体的によく保存されていた。これらの鳥類の系統分類学的な関係を考えると、これら以外の鳥類でも基本的には共通 α サブユニットのアミノ酸配列はよく保存されてい

と考えられる。

第 3 章

濾胞刺激ホルモン サブユニット 遺伝子のクローニング

第1節 序

濾胞刺激ホルモンβサブユニット (FSHβ) 遺伝子のクローニングはこれまで、ヒト (Jameson *et al.*, 1988) ウシ (Kim *et al.*, 1988) ラット (Gharib *et al.*, 1989) ブタ (Hirai *et al.*, 1990) ヒツジ (Guzman *et al.*, 1991) マウス (Kumar *et al.*, 1995) の哺乳類と、キングヨ (Sohn *et al.*, 1998) ティラピア (Rosenfeld *et al.*, 2001) の魚類で報告されてきた。また、鳥類においては cDNA の塩基配列がウズラ (Kikuchi *et al.*, 1998) とニワトリ (Shen & Yu, 2002) で、化学的手法により決定されたアミノ酸配列がダチョウ (Koide *et al.*, 1996) で報告されているだけであった。本章ではトキの FSHβ 遺伝子のクローニングとその結果得られた情報について述べる。

第2節 材料及び方法

材料

トキ (*Nipponia nippon*) のゲノム DNA (第2章参照)

方法

1) PCR

まずトキ FSHβ 遺伝子の部分配列を得るために PCR を行った。プライマーは哺乳類と魚類の FSHβ サブユニットのアミノ酸配列をもとに設計され、ウズラ FSHβ cDNA の部分配列の増幅に用いられたもの (Kikuchi *et al.*, 1998) を用いた。プライマーの配列を以下に示す。

FSH-F: 5'-TG(T/C)TCIGGITA(C/T)TG(C/T)T(A/T)(A/C)ACIA(A/G)(A/G)G-3'

FSH-R: 5'-CA(A/G)TCIGT(A/G)CT(A/G)TCI(C/G)T(A/G)TC(A/G)CAI(G/T)

TI(C/T)C(A/G)CA(A/G)TG(A/G)C-3'

反応は 95 1 分、50 1 分、72 3 分のサイクルを 30 サイクル行った。この反応をゲノム DNA を鋳型に Premix Taq (Ex Taq version) (Takara) を用いて行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果、800bp 付近に 1 本のバンドが確認されたので、これをゲルより切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) にて精製し、DNA Ligation Kit Ver.2 (Takara) を用いて pCR2.1 プラスミドベクター (Invitrogen) にライゲーションした。この反応液をコンピテントセル JM109 (Takara) に形質転換し、得られた白コロニーからプラスミドを抽出して、シーケンシングを行った。シーケンシング反応は第 2 章で述べた通りである。シーケンス後、1 つのクローン (pIFPCR) を選んで、後の実験に用いた。

2) サザンブロット解析

ゲノム DNA 1 μ g ずつを制限酵素 *Eco*RI または *Bam*HI で消化し、サザンブロット解析を行った。プローブには pIFPCR をランダムプライム法により [α -³²P]dCTP で標識したものを用いた。その他は 2 章に述べた方法に従った。

3) ゲノムライブラリーの作製とスクリーニング (1)

サザンブロット解析の結果、*Bam*HI 消化した DNA のレーンでおよそ 10kb の位置にシグナルが 1 本のバンドとして認められた。そこで、この断片をクローン化するため、*Bam*HI 消化 DNA と λ EMBL3 ファージベクター (Stratagene) を用いてゲノムライブ

ラリーを作製した。*Bam*HIで消化したゲノム DNA 約 1.5 μ g を DNA Ligation Kit Ver.1 (Takara) を用い、 λ EMBL3 ファージベクター 1 μ g にライゲーションし、この反応液 10 μ l 中 4 μ l を Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) を用いてパッケージングした。その結果、 5.0×10^4 pfu のライブラリーが得られたが、これを 8.0×10^9 pfu にまで増幅し、そのうち 1.0×10^5 pfu についてスクリーニングを行った。プレハイブリダイゼーションの条件は第 2 章に述べた通りである。ハイブリダイゼーションは、pIFPCR をランダムプライム法により [α - 32 P]dCTP で標識したものをプローブに用い、60 $^{\circ}$ で一晩行った。ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 60 $^{\circ}$ の 1xSSC, 0.1%SDS 中で 20 分間洗浄、さらに 60 $^{\circ}$ の 0.1xSSC, 0.1%SDS 中で 20 分間洗浄した。シグナルの検出は第 2 章で述べた通りである。第 2、第 3 スクリーニングの後、1 つのポジティブクローン (IF1) が得られたので、*Bam*HI と *Eco*RI で切断後、pBluescriptII プラスミドベクター (Stratagene) にサブクローニングしてシーケンシングを行った。

4) ゲノムライブラリーの作製とスクリーニング (2)

シーケンシングの結果、IF1 は FSH β 遺伝子の 3' 側の部分を欠いていることが明らかになったため、残りの 3' 側の部分を得るために、再度ライブラリーのスクリーニングを行った。pIFPCR と IF1 の塩基配列の比較から、pIFPCR の 3' 側の部分およそ 180bp が IF1 では得られなかった 3' 側の部分であることが判明したため、pIFPCR を *Bam*HI で消化し、アガロースゲル電気泳動後、約 180bp の断片を回収することで、その部分の配列を単離した。これをランダムプライム法により [α - 32 P]dCTP で標識したものをプローブに用い、ライブラリーをスクリーニングしたが、ポジティブクローンを得ることはできなかった。そこで、増幅したライブラリーでは目的のクローンを得ること

ができない場合があると考え、新たなライブラリーを作製し、増幅せずにスクリーニングに用いることにした。新しいライブラリーは *Bam*HI 消化したゲノム DNA を λ EMBL3 ファージベクターにライゲーションし、パッケージングして作製した。この結果、 1.6×10^5 pfu のライブラリーが得られたので、前述の 180bp のプローブを用いてスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーションは 50 で一晩行い、その後、ナイロン膜を 50 の 3xSSC, 0.1% SDS 中で 20 分間洗浄した。第 2、第 3 スクリーニングの後、3 つのポジティブクローンが得られたが、制限酵素処理による解析の結果、同じ電気泳動パターンを示したことから、これらはいずれも同一のインサートを含むものと判断し、このうちの 1 つ (IF4) をシーケンシングに用いた。180bp の部分配列をプローブに用いたサザンブロット解析の結果、約 3.5kb の *Bam*HI-*Hind*III 断片がこのプローブとハイブリダイスすることがわかったので、この断片を pBluescript II プラスミドベクターにサブクローニングしてシーケンシングを行った。シーケンシングには BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、Applied Biosystems 社製のオートシーケンサー ABI PRISM 377 DNA Sequencing System で解析した。

第3節 結果

トキの FSH β 遺伝子の塩基配列を決定するのに用いたシーケンシング戦略を図 3-1 に示した。まず、PCR 産物をクローン化してシーケンシングした結果、780bp の塩基配列が決定された。この配列をウズラ FSH β cDNA (Kikuchi *et al.*, 1998) と比較したところ、この配列は 582bp のイントロンを含む FSH β 遺伝子の一部であると結論された。こ

の部分配列をプローブに用いたライブラリーのスクリーニングでは、1つのクローン(IF1)を得ることができた。IF1のインサートはおよそ10kbであったが、そのうち片側からの4,059bpの塩基配列を決定した。この塩基配列をウズラ FSH β cDNA や pIFPCR の配列と比較した結果、このクローンには遺伝子の3'側の部分が含まれていないことが明らかになった。そこで、再度ライブラリーを作製し、スクリーニングした結果、3つのポジティブクローンが得られた。このうち1つのクローン(IF4)のインサートおよそ10kbのうち片側から3,620bpについて塩基配列を決定した。

IF1とIF4は*Bam*HIの切断部位によって互いにつながっていることがpIFPCRの配列により確認され、最終的には、IF1とIF4で得られた配列を合わせて7,633bpの塩基配列が決定された。この配列をウズラとニワトリのFSH β cDNA (Shen & Yu, 2002)と比較して相同性の高い部分をエクソンと判断することでエクソン-イントロン構造を推測した。特に、転写開始点とポリA付加部位については、5'末端と3'末端がRACE(Rapidly Amplified cDNA Ends)法によって決定されているニワトリFSH β cDNAの配列を参考にして推定した。また、エクソンとイントロンの境界はgt-agルール(Breathnach & Chambon, 1981)にしたがって決定した。その結果、この配列は2,820bpの5'上流域と、34、160、2,549bpの3つのエクソンと458、582bpの2つのイントロン、1,030bpの3'下流域からなっていることが明らかになった(図3-2)。なお、推測した転写開始点上流27bpと47bpの2箇所にTATAAA配列があり、推測上の3'非翻訳領域には5箇所にポリA付加シグナルAATAAAが見られた。また、3'非翻訳領域には、mRNAの不安定化に關与する配列ATTTAが8箇所見られた。さらに、塩基配列よりアミノ酸配列を推測し、ウズラと比較した結果、94.7%という高い相同性が得られ、この塩基配列がトキのFSH β 遺伝子をコードするものであることが確認された。

トキ FSH β 遺伝子のエクソン-イントロン構造を既知の魚類及び哺乳類のものと比較し

たところ(図 3-3) 3 つのエクソンと 2 つのイントロンからなる構造は他の動物のものと同じであることがわかった。イントロンの位置も他の動物と同様、第 1 イントロンは非翻訳領域に、第 2 イントロンは翻訳領域の中に位置していた。特に、翻訳領域の中にある第 2 イントロンの位置をアミノ酸配列のアライメントをとって比較を行った結果(図 3-4) トキのものは魚類、哺乳類のものと同じ位置にあることがわかった。

5' 上流域の塩基配列を哺乳類やキングヨのものと比較したところ、ほとんどの部分では目立った相同性は見られなかったが、プロモーター領域については哺乳類のものとアライメントをとることができた(図 3-5)。この領域では、ヒツジ FSH β 遺伝子で 1 つの progesterone responsive element (PRE) と 2 つの AP-1 responsive element が転写調節配列として報告されている(Webster *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2001)。トキの相当する部分の塩基配列を見ていくと、PRE の 15 塩基中ではヒツジのものとは 2 箇所、コンセンサス配列とは 6 箇所の塩基が異なっていた(ヒツジの配列はコンセンサスの配列とは 4 箇所で異なっていた)。また、上流の AP-1 responsive element の 7 塩基では、トキはヒツジの配列と 2 箇所が異なっていた(ヒツジの配列とコンセンサス配列は一致)。さらに下流の AP-1 responsive element の 7 塩基では、ヒツジとは 3 箇所、コンセンサス配列とは 2 箇所異なっていた(ヒツジとコンセンサス配列は 1 箇所異なっていた)。

推測されるアミノ酸配列を他の鳥類と比較した結果(図 3-6) ウズラと 94.7%、ニワトリと 95.4%という高い相同性を示した。また、ダチョウの FSH β サブユニットは C 末端が他のものより 5 アミノ残基分短くなっているが、この部分を除けば、トキとダチョウの相同性は 93.4%であった。

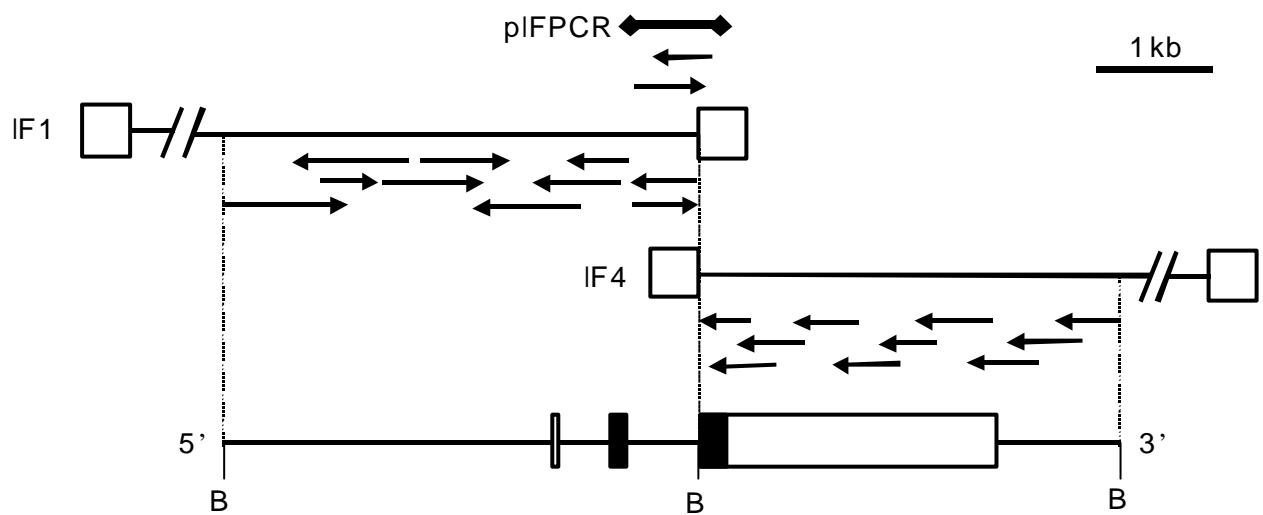


図3-1. トキのFSH β サブユニット遺伝子のエクソン-イントロン構造とシーケンシング戦略

上から順にpIFPCR、IF1、IF4を示した。矢印はシーケンシングの方向と範囲を表す。最下段にはトキFSH β 遺伝子の推測されるエクソン-イントロン構造を示した。ボックスはエクソンを表し、塗りつぶした部分は翻訳領域を、白抜きの部分は非翻訳領域を表す。また、実線の部分は5'上流域、イントロン、3'下流域を示す。「B」は *Bam*HI サイトを表す。

gaattccaggagtagtggcttcaataattccactgtgacattctgggcaacacctagcattcagcctggaagcataatgacaactgctaaa
tctaggatgggcaactactgcttaagaactagatagataaaaaccactacttaacgcttgaaagttgctgtagcatgtgaagaggagcgtt
cttccctctgacattattccctaaattgaaatataaaccatttaacatggaaaacatttctatttctcaaatagatacaaaattcagtaa
cgcagaacctatgtataatgttcacatatatatgaaaattatagctttctggataaataacatttgctattcccttcacaattaccataa
ccttttttaattcaataggaatataaaacttgaaggagtagatagtagtagcacaacatttcccagaggtagaactaataatctt
agaaagacatatacttacacaacatcttgcccatcatgagaagtaattccttagcgtatcttcttaacaaaagggtgtgggaacaaaatca
aagtcaaccaagtaacaactcaccaaattaccactcctcagaggtaggctgggtggttagttgattccagtttgtaatttctattacc
taaaaaatgcataattcatatatccacacaatgaatttagcagagctgtagctgggagaaccaacctagaactaatgattccagaacaaat
gcccttgaagtcagtacaggacgaaatcctcctgttaaaaaagtttgctgtgtttacaatgtggcttcagtagctctccagtgagaaca
ctctgtgaagcgtttcctgtcaacctccccctcattcccactcccacatcaatcccatcaattacgctgctacagctgttcatttatt
gtggaacaaaattgatatggattaacaacaatgctgtaaaagacagctgggtgggttttttgccttttaacagaatgatttccctaattt
gtgttgccacaagtgaggaggtgagtgggccagaacaaggaactaggggaggggaagaaacagcatggttaggggctaaacttgcactctc
tgcttgtgaaattatgggttttagtgaatgtatatgacttctcacaacatgaaacagatcattgcaactgagagattagatatttctgt
attctcctgcaaatgaagtttatttgggttttatttaatttgacttagaaaaggcaagatcctcagtagggatataactaatgttaatcag
cttttgtctggcatctctggcattaatgatttacagcacgtgagaatcttctctgacaagacagatcatgttgacagtaaaagacacaaa
agacaattatcaaaacatcacagagtttatattagtaaagaggagaatgtctgtcttcttgacttctttatacatttaattgagctgtat
tctcattcaaaacaaaattattattacaggatattgtccaggcgaagttgtagatcactttctaatttgggtgtgataggaaattcattaac
aaattaagggtattgcagactggatggaactggaacagatggccagcttgcaggaccacaggaaggtctgagacacttaagagctcatt
tgtaaaagccattttggaaagaatcctgtctgcaggacagagagaatttcttttcatgataaaatgtctgtatgtccttgccctagtttct
tttgggtgagatttctgttaaaagtgcagactgaccataatagaacagtcatacaaaagcaagactggctgttcttgggcagatgatagtaa
atacagtgctactgtgagtcattttcccagaagtgtatgtggaagtcacaacaaagttatttctctgtcatttcttgggtgaaggacac
accgctaacttgtgaatgcaggaaaaggcagtgagcaggggaacactattcatagaatcttttattatcatgatgaactaggggaatgca
ttcaagctgagtttgcattggttatctgttaaaaaatattagcattttccctgtaacatgacaatacttgatctgagatcactaacagaaga
cacagatctggaccctcactgtgacatctttatagtcctttccacaatacacagacatcccttacataagtttaaaaaaatgtgaccgtgt
gacagacaggaaccaggattgcacatactgggtagaaatctgaattttgaaaagccacagtggtattttaaatggttaagaaaagtcga
gttacggtttaacaaaactctcaatactagctttcttggaccacagatcaataaacaagtatatatgcagctcactgggtaagacctaat
tcagagaaaagcaattaagattgataccctgaaaaactcaggaacatgttcatttagccaagaagcgtctagcaatatctctgtctatgaa
ttaccaaaaggacaaacttgaccccaagcctatcagtttgagggtgcacataaaacacagttaaaagacttgaactttcttttccaaaa
ataggcttctcagccttcattcaaatgtggcatggttcagctatttctaaatgccactgaatcaaatccagggaacttctaaaaagac
attgtgacagtaaccttcaccatcacttctcagtggtgttttgccttttcttttttgccttaacaaggcttgatctcactgtctggctga
acattaatccactttcaccaagtaccaaacgaatgcttgctgcattaatacgtgcgaatcctcaagggtataaaattacaccaatttagta
taaaagggtgagcaggggctttctttt**cacTACAGCTACTACCAGGAAGGCAAGTAGAATACAG**gtaagttttcatcagatcctgatcta
gaaatcttttttcaaattgcaaacactgtatgtaattaattgcttctgaagaatacattatcctttgctctttctccttgccttctt
ttctttctccttaagacaggacacattctctgtatggaaacttagataaaaaatatttcattgaaagtggtatggtactctgctattatt
attctgcagagattgctgacatgccacttcagtcgctttggaaaatcaaaactccgttaacaataaacatacagatagatttatttcatgg
ctttatcctatgttctcactgatgtttctgaaagcttgctattatagaaccacttgaggataatgtgaaggctcaacttctctctatttc
tataaatatttctgttgaaaataactatacatgtttctctggtatagatacatttttgcctttatacacagG ATG AAG ACA GTT
Met Lys Thr Val
-18
AAT TGT TAT GTG CTG TTA TTT TGC TGG AAA GCA ATT TGT TGC AAT AGC TGT CAG CTT ACC AAC ATT
Asn Cys Tyr Val Leu Leu Phe Cys Trp Lys Ala Ile Cys Cys Asn Ser Cys Gln Leu Thr Asn Ile
-10 +1
ACC ATA GCA GTG GAA AGA GAA GAA TGT GAA TTC TGT ATT ACA GTG AAT GCC ACG TGG TGC TCA GGA
Thr Ile Ala Val Glu Arg Glu Glu Cys Glu Phe Cys Ile Thr Val Asn Ala Thr Trp Cys Ser Gly
+10 +20 +30
TAC TGC TTC ACG AGG gtgagaatcttaagtttaatttctaaataactcatttctccagtccttaatgaacacataggcaggatga
Tyr Cys Phe Thr Arg
+35
gccttgtgaaacaacaggttgagtaacttctgtgctatttgacaggaaagtagatacacagccagcttgaactacaaagcgaagggtgaa
aagatgccagtaaaaattcaggtcttctttaaactggctgcacacatgtttatattgtataactagagttgaaagtaatacaatctggatct
ctgccttgtgttcaatttgggttgcaaatggatacaataaagcagcctttagtagactcctctacttttccaaataatttgaagaatcaa
gtaattgacctgaaagattgtctggtgatggtatgacacaaatttcccatatcagtcctcctgaaaggagaaatctaaggatctaggtta
aattataagagctgatgcaaaccttggatcagtggtggttttcccatgtggtttaaattagtttccacatcaggtcctttattttgaa
aaatttggaaattctgcctcatacaaaatttcaaaacaagtatttccttctgttaattttcag GAT CCA GTA TAT AAA TAT CCA
Asp Pro Val Tyr Lys Tyr Pro
+36 +40
CCA GTA TCA TCT GTT CAG CAA ACA TGT ACT TTC AAA GAG GTT GTG TAT GAA ACA GTG AAG ATC CCA
Pro Val Ser Ser Val Gln Gln Thr Cys Thr Phe Lys Glu Val Val Tyr Glu Thr Val Lys Ile Pro
+50 +60
GGC TGT GGT GAC CAT CCC GAA TCT TTT TAT TCG TAC CCA GTA GCT ACT GAG TGC CAT TGT GAG ACC
Gly Cys Gly Asp His Pro Glu Ser Phe Tyr Ser Tyr Pro Val Ala Thr Glu Cys His Cys Glu Thr
+70 +80
TGC GAC ACT GAC AGC ACT GAC TGC ACC GTG CGA GGG CTG GGG CCA TCC TAC TGT TCT TTC AGT CAG
Cys Asp Thr Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Ser Gln
+90 +100

図3-2. (次ページに続く)

AAT GGA AGT AAC CAA TGA AGGGTACTTGAGATGGCAGCTTGGCTTTACATGTTCACTTCTAAATAAAAGGTACTGATCGGGCTTA
 Asn Gly Ser Asn Gln Stop
 +110 +113
 AGTGGAAGATAATAGGCAAGGCTATTTAGAAACTGCCAAGATTGAAACAAAGATTTTAAAGGCCAAAATGGAGAGCTACTGACTAAACTT
 CTCTTCAGGCCTTCCCTACTTATCCCATCAGTTTCCTTAAATCATTTCATATGTCTATAGAACACTGCTTCCGATTCTTCTGCCCTT
 ACCTCCTCTTCTTCTATTACACCTTCATTCTTTATAGTCCTGTATTTCCACTGCCTAGTTCACTTAGATTATTTCTATGCTATCCTATG
 CTTTCAAAACGTTCCCAATTTCCAAGTCTTTATTATCACCTGCTTTCCATTTCTCCTCAGAACGCACCTATTTTAAAAAGCCTTGCAAGCA
 CTGGTTTTCTTACAACCAACAGCTATGCCCTCACTTTCTATTAGCTGGACTGTAAACCTCTCTGAGCCGAGATCCTGACTTTTTTTTTTT
 TTGGCAAAATATTTTCATATAGTCATTATGCTCTGTAAATAATAACAGCATGTTTATTTACAAGCCAAAATCTATGTTCAAATGTTGAATG
 TCACCTGAACTCTTGTGCTTTCTCAGTAAGGCTTGTAGCTCAGGCTCAGTGACACAATAACGCAAAATAGCATGAACTCTAGTTTATGCC
 TGGCTAACTTGAAAAAGAATCATCAGCCATCTACTTTCACCTGAGTAAACATATCCTAAGTTAGTTAAACAATTCTGAAAAATTTGCTG
 CATCTCAGAAACACTGGATTTCTCTCATTCTGCAACAAAATGTAAGAATGAGAATTTTTTAAACACTATTTAACATAGGCGTCTCACAA
 ATTATTTAGGGATGAATCTAGAGGCACCTGATCCCAGTATGCCAGTAAACATGGTGTGATAACATGCCTTGAAAGTAGCTCAGTTAGTCCCT
 CTGAGAAATGGAAGTTTATATAGAGTTCTGCAGCAACCTAATTCTGCAATGGCCAATATGAAGTTGGGATGTTGGGAAGCAAGCTGGAGG
 ACCGGCTGAATCAGAATGGAATTTATCGCACGTTATTGGGAAAATTATCTGAAACCGACAGAATGAAACCCATCAGGAAAATGAAAAG
 ATACCGCTCTTCATCAGAAACAATCACCTACACAAACACAGAATGGAGAGCAACTGGTTCAGCAGCAGTTCGGCACCAAGACTTGGCGG
 TTATATGAGCTAAGTATGAGTCAACAGTATGACACCACTGCAGAAAAGTGGGAATTAAGGAGTAGAGACTACAAGACACAACCTACTTC
 CACCATTCTGCTCAACATGACAAGAGTCTCAGCGGAGTTGTTATTTCCAGCTTTGGACACAGAACTTCAAGGCATCGAAAAACGGAGAA
 AATCCACAGAAGAGTAATAAAAATGGAGAGAGGCCATAAAAAATATCTTAGGAGAAAAAGATTTAAATAAATGTGGTTGTTTTGCTTACGG
 GAGGTAACACTTAGAGGGGGGAAATTAGTGGAACCTTTTACATGCTTGAAGACTGTTACAAAGAGAAAAAGGAACAGTACAGTTCTCCATG
 TTCATAGTGAACAGAACAACTAATGAAAGATTAGAGTAGCCACTAGCAAACTTTTGGAAAGGTTAGACAGCCAGACGCTGAAATAAAT
 TGTTAGGGGTTTCAGGAAGGAAGGGAGAGAGAGTGGGCTCTGTGGAGTAGTGACCACTACAGGCTTCAAGAACACATTGAACCTGTTGG
 GAATGACAGAGATAAAGTTAATTTGCCATGAGGAAGGAATGAAGTAGACGACCTCTTGAGGGTGCCTGACATGTCTGCTTTTGAGACCC
 TTACAGACATGTTTATTTAAAGGGAATTTGTCGGTTACTCTGATGTCTCTTACAATAGATATTTTAACTTATTTTCACTTTTGTCTTTT
 TTACTGAAAGATATTAGATCTCTTAACCTTTATTTATAAGATTTACTGCATGGACATTTTCTTTGGTCTACTGAAGTTTTTAAAGTGGTA
 AAGTAATAGGTAAATCAAATTTGCCTCTCACTCATTTTCAGTTTTTAAACATGAGTTGACGTTGGTTAAACTAAGCATATTATTAATTTTCA
 GAATTATTCCATTCTGGATGAGGGAATTTTGAATTTAAATTTGCAAAACAGAGTAGCTTGTAGTAAAAAGTATGGAAAAAGATACGCTTT
 CAAAATAGATCTGTAAACACCTGTATTGTCTGCTGTGCATTTTGAACAATAAAAATAATTTTGTGCACTTCTGTTATGTGCTTTaata
 agccaattaaaaaccttataagtccacctgcctacttcactatgctttaaatacacacttccccccacacacataatttttttcatataa
 ctaatacactcatctgagccatatttgattatagacctgcagtagctgtgtccagctctggggctcctcagcactataaagacatggacct
 gttggagcgggtccagaggagggccacaaaaatgatcagagggtggaacacctctgctatgaggaaaggctgaaagagctggggctctt
 tagcctggagacaagaaggctcgggggagaccttattgctgcctttcaatacttaaagggggcttataagaaagatggggacagactttt
 tagcaggcccaatagcgataggacgaggggtaattggttttaactaaaaggggtagattcagactagatataaggaagaaactttttac
 aatgagggtagcgaacactggaacgggtgtgtccagagagggtgtagatgccccatacttggaaacattcaaggacagggctggatggggc
 tctgagcaacctgatctagttgtgtgatgtccctgccaaattgcaggggggatggactagatgacctttaaagggtcccttccatcccaaagc
 attctatgattttatatggccaaatcacatcaaataaaagcctgggtatattttagcctgacctcagtaataagatggtgaaatattatgta
 gttgtaacacacagaactgtggatgagaataaagattatcagtaaatattgtatttaaactatagggattagaacctctccagagctgtg
 tccacatctctgtcacaattagcttgcatgtaaaacccaaaaattatatagctctcatttcatccatcagacaaatgcaaccactcattt
 tcattttgcaaatgaatctattcagaaccttggaattaaaactgtaactaatgcagtcacaaagagtattgaggttaattctcagaatgctg
 gcaaaaaaaatcctaatacagcagcactgcaagctt

図3-2. トキのFSHβサブユニット遺伝子の塩基配列

エクソン部分の塩基配列を大文字で、5'上流域、イントロン、3'下流域の塩基配列を小文字で表した。推測される転写開始点を矢印で示した。TATAAA配列とポリA付加シグナルには下線を引き、ATTTA配列を実線で囲った。推測されるアミノ酸配列を塩基配列の下に示し、成熟蛋白質のアミノ末端を+1として順に番号を付けた。

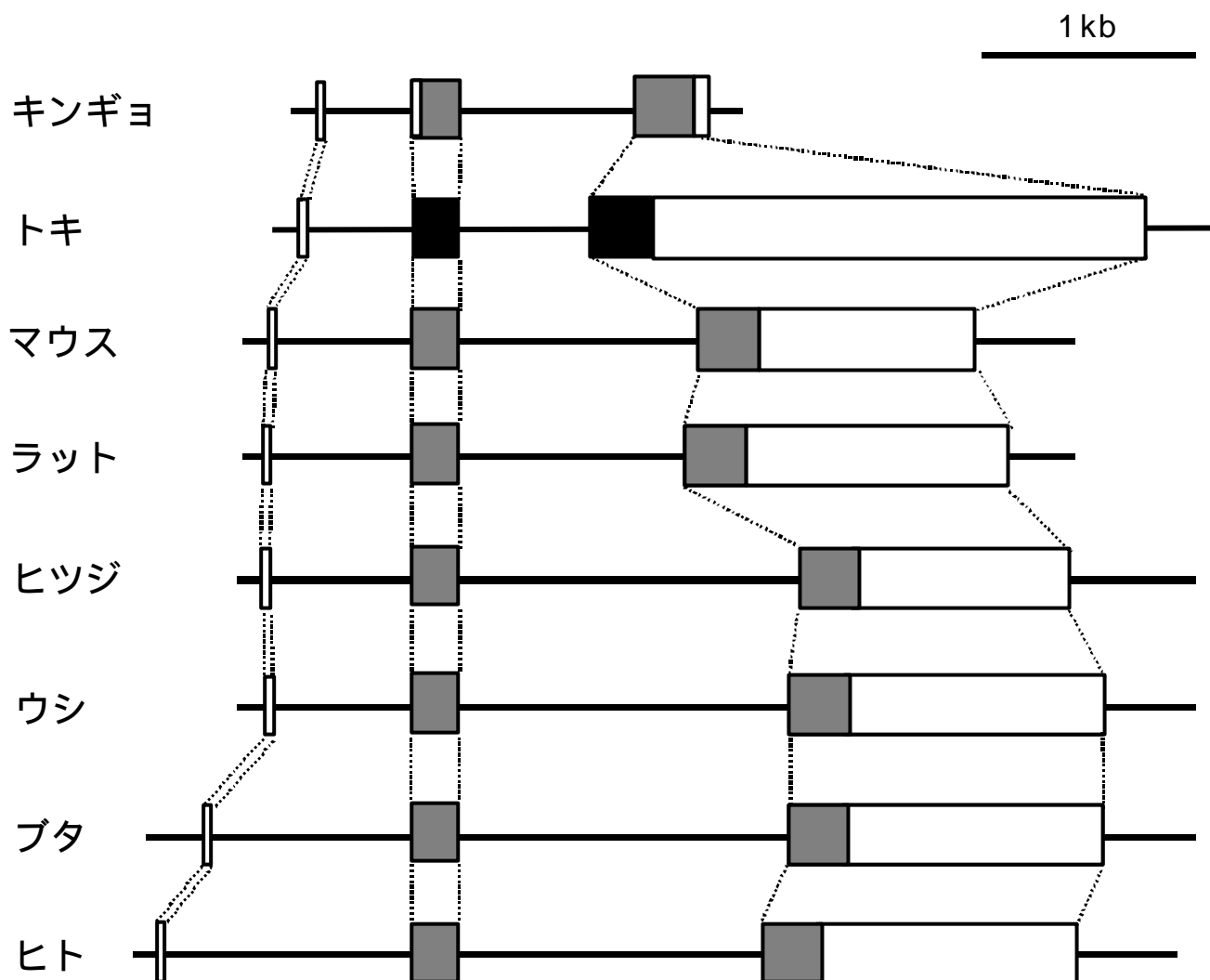


図3-3. キングヨ、トキ、哺乳類のFSH β サブユニット遺伝子のエクソン-イントロン構造の比較

ボックスはエクソンを表し、塗りつぶしの部分は翻訳領域を、白抜きの部分は非翻訳領域を表す。実線の部分は5'上流域、イントロン、3'下流域を示す。相当するエクソンを破線で結んだ。

参考文献

キングヨ (Sohn *et al.*, 1998)、マウス (Kumar *et al.*, 1995)、ラット (Gharib *et al.*, 1989)、ヒツジ (Guzman *et al.*, 1991)、ウシ (Kim *et al.*, 1988)、ブタ (Hirai *et al.*, 1990)、ヒト (Jameson *et al.*, 1988)

	+17		↓		+59
キングヨ	CGSCITIDTTACAGLCKTQ	ESVYRSPLMLSYQNTCNFREWTYE			
トキ	CEFCITVNATWCSGYCFTR	DPVYKYPPVSSVQQTCTFKEVVYE			
マウス	CRFCISINTTWCAGYCYTR	DLVYKDPARPNTQKVCTFKELVYE			
ラット	CRFCISINTTWCAGYCYTR	DLVYKDPARPNTQKVCTFKELVYE			
ヒツジ	CSFCISINTTWCAGYCYTR	DLVYKDPARPNIQKACTFKELVYE			
ウシ	CGFCISINTTWCAGYCYTR	DLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYE			
ブタ	CNFCISINTTWCAGYCYTR	DLVYKDPARPNIQKTCTFKELVYE			
ヒト	CRFCISINTTWCAGYCYTR	DLVYKDPARPKIQKTCTFKELVYE			

図3-4. キングヨ、トキ、哺乳類のFSH β サブユニット遺伝子の第2イントロンの位置の比較

矢印とスペースでイントロンの位置を示した。アミノ酸配列の上に記した数字はトキの成熟蛋白質のアミノ末端を+1としたときのアミノ酸の位置を示す。

参考文献

キングヨ (Sohn *et al.*, 1998)、マウス (Kumar *et al.*, 1995)、ラット (Gharib *et al.*, 1989)、ヒツジ (Guzman *et al.*, 1991)、ウシ (Kim *et al.*, 1988)、ブタ (Hirai *et al.*, 1990)、ヒト (Jameson *et al.*, 1988)

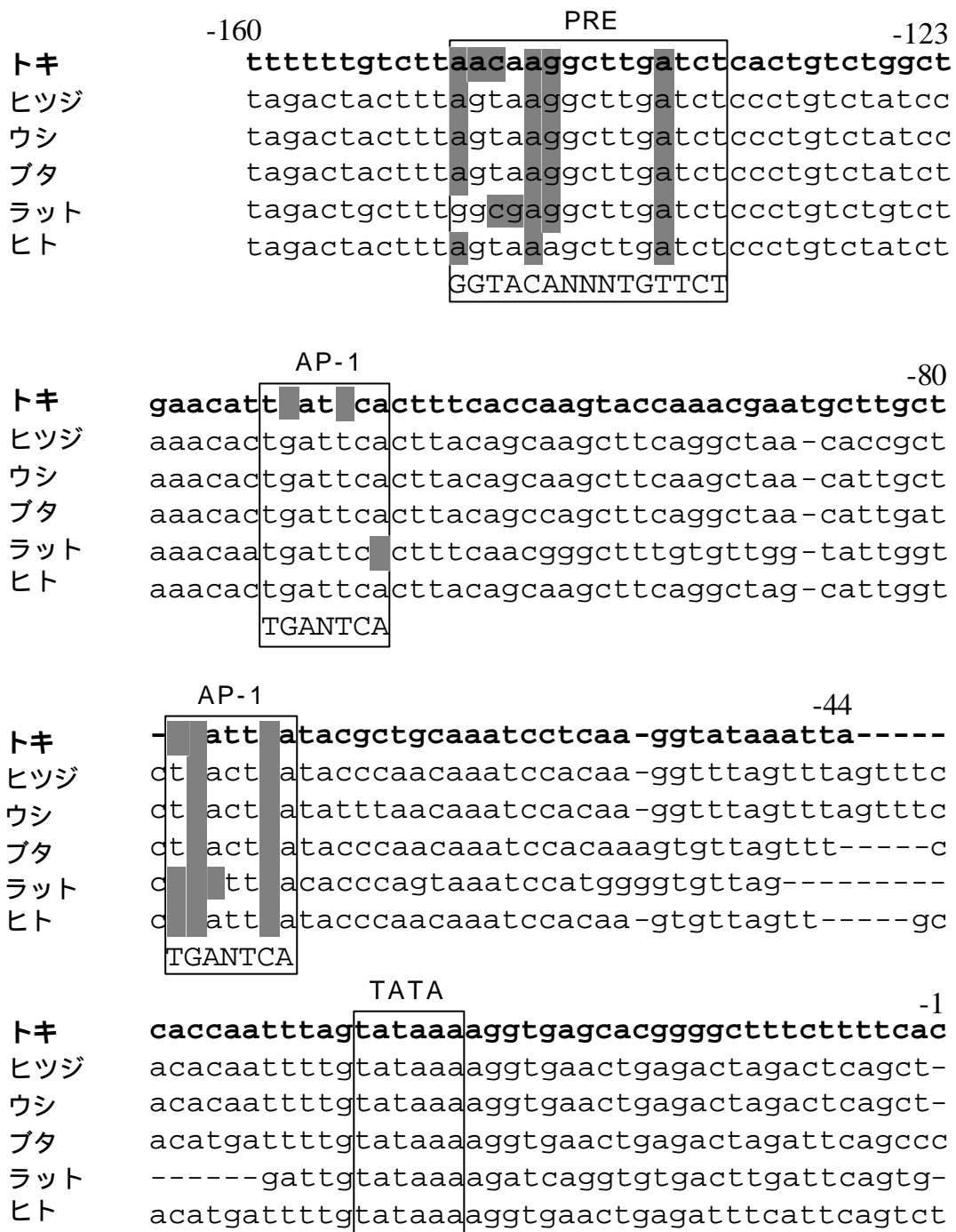


図3-5. トキと哺乳類のFSHβサブユニット遺伝子のプロモーター領域の比較

ヒツジで報告されている転写調節配列、progesterone responsive element (PRE) (Wevster *et al.*, 1995) とAP-1 responsive element (Huang *et al.*, 2001)、TATAボックスを実線で囲み、各転写調節配列の下にコンセンサス配列を大文字で示した。コンセンサス配列と異なる塩基は影付きで表した。塩基配列の上に示した数字は、トキFSHβ遺伝子における推測上の転写開始点からの位置を表す。

参考文献

ヒツジ (Guzman *et al.*, 1991)、ウシ (Kim *et al.*, 1988)、ブタ (Hirai *et al.*, 1990) ラット (Gharib *et al.*, 1989)、ヒト (Jameson *et al.*, 1988)

第4節 考察

本研究では、鳥類で初めて FSH β 遺伝子の構造を明らかにした。トキ FSH β 遺伝子のエクソン-イントロン構造を既知のものと比較した結果、魚類や哺乳類で明らかにされている構造と同じであることが明らかになった(図 3-3、図 3-4)。このことから、おそらくトキ以外の鳥類でも、基本的にはこの構造は保存されているものと考えられる。魚類、哺乳類と比べてトキで特徴的なのは、第3エクソンがかなり長いことであるが、これは3' 非翻訳領域が長いことに由来するものである。ただし、これはウズラとニワトリの FSH β cDNA の配列と比較して推測した3' 非翻訳領域であり、この推測上の3' 非翻訳領域にはポリ A 付加シグナルの配列 AATAAA が5箇所に見られるため(図 3-2)、実際のトキの3' 非翻訳領域はこれよりも短い可能性もある。

5' 上流域については、プロモーター領域でのみ哺乳類のものとアライメントをとることができた(図 3-5)。しかし、ヒツジ FSH β 遺伝子で報告されている転写調節配列 progesterone responsive element (PRE) や AP-1 responsive element に相当する部分をトキで見ると、ヒツジの配列ともコンセンサス配列とも異なっていた。トキと同様にラットやヒトでも、ヒツジの配列やコンセンサス配列と異なっているものがあるが、これらの機能については現在のところ明らかにされていない。ヒツジの PRE は15塩基中4塩基、下流の AP-1 responsive element は7塩基中2塩基がコンセンサス配列と異なっているのにも関わらず機能を保持していることから、これらが機能を持つためには必ずしもコンセンサス配列と同じである必要はないと考えられるが、トキの相当する部分の配列は、いずれもヒツジのものよりもさらにコンセンサス配列とは異なっており、これらが機能を保持している可能性は低いのではないかと考えられる。

また、トキ FSH β 遺伝子の推測上の3' 非翻訳領域には mRNA の不安定化に関与すると

されている配列 ATTTA (Shaw & Kamen, 1986; Chen *et al.*, 1995) が 8 箇所に見られた。この配列はウズラやニワトリの FSH β cDNA の 3' 非翻訳領域でも 5 箇所で見られることが報告されている (Kikuchi *et al.*, 1998; Shen and Yu, 2002)。Akashi *et al.* (1994) は、ウサギ β -グロブリン遺伝子の 3' 非翻訳領域にこの配列を数を変えて組み込んで、この配列の数が増えるほど mRNA の安定性が損なわれていくことを示している。したがって、トキの FSH β mRNA はウズラやニワトリのものよりも不安定である可能性があると考えられる。

トキを含め、これまでに報告されている鳥類の FSH β サブユニットのアミノ酸配列を比較した結果、システイン残基や、糖鎖が付加すると推測されるアスパラギン残基などの特徴的なアミノ酸残基を含めて、全体的によく保存されていることが明らかになった。ただし、ダチョウの C 末端のみが他の鳥のものよりも 5 残基短くなっている点が大きな違いである。ダチョウ以外の鳥類のアミノ酸配列は塩基配列から推測したものであるが、ダチョウの配列は蛋白質の化学的分析によって決定したものであることから、この違いは翻訳後修飾などによるものである可能性も考えられる。この C 末端の違いを除けば、FSH β サブユニットは基本的には鳥類全般でよく保存されているものと考えられる。

第 4 章

甲状腺刺激ホルモン サブユニット 遺伝子のクローニング

第1節 序

甲状腺刺激ホルモン β サブユニット (TSH β) 遺伝子のクローニングはこれまでラット (Carr *et al.*, 1987) マウス (Gordon *et al.*, 1988) ヒト (Wondisford *et al.*, 1988; Guidon *et al.*, 1988) キンギョ (Sohn *et al.*, 1999) でしか報告されていなかった。また、鳥類では cDNA のクローニングがウズラ (Kato *et al.*, 1997) ニワトリ (Gregory & Porter, 1997) タイワンアヒル (Hsieh *et al.*, 2000) で報告されているのみであった。本章ではトキ TSH β 遺伝子のクローニングの結果、明らかになった遺伝子構造および推測されるアミノ酸配列について述べる。

第2節 材料及び方法

材料

トキ (*Nipponia nippon*) のゲノム DNA (第2章参照)

方法

1) PCR (1)

まず、トキ TSH β 遺伝子の部分配列を得るために PCR を行った。ラット (Chin *et al.*, 1985) マウス (Gurr *et al.*, 1983) ウシ (Maurer *et al.*, 1984) ウシガエル (Buckbinder & Brown, 1993) ニジマス (Ito *et al.*, 1993) の TSH β cDNA 間で保存されている部分の塩基配列をもとに設計した以下のプライマーを用いた。

TSH-F1: 5'-TGCCTI(A/G)CCAT(C/T)AA(C/T)ACIAC(C/T)(A/G)T(C/T)TG-3'

TSH-R1: 5'-G(C/T)C(A/T)GT(A/G)TTACAI(T/G)T(T/G)(C/T)CACA-3'

反応は 95 1 分、50 1 分、72 3 分のサイクルを 30 回とし、ゲノム DNA を鋳型に、Premix Taq (Ex Taq version)(Takara) を用いて行った。この PCR 産物を電気泳動した結果、およそ 1kb の位置に 1 本のバンドが観察されたので、この DNA をゲルから切り出し、pCR2.1 plasmid vector (Invitrogen) にライゲーションし、クローン化した。得られたクローンのうち約 1kb のインサートを持つクローン (pITPCR) を選んでシーケンシングを行った。シーケンシングには Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB) を使い、DNA sequencer Model 4000L (LI-COR) により解析した。

2) ゲノムライブラリーの作製とクローンの単離 (1)

ライブラリーの作製に先立ち、ゲノム DNA 1 μ g ずつを制限酵素 *Eco*RI または *Bam*HI で消化し、サザンプロット解析を行った。プローブはトキ TSH β 遺伝子の部分配列 (pITPCR) をランダムプライム法により [α -³²P]dCTP で標識したものをを用いた。それ以外の点は第 2 章で述べた方法に従った。その結果、*Eco*RI 消化した DNA のレーンでは約 4kb の位置に、*Bam*HI 消化した DNA のレーンでは約 10kb の位置にシグナルが 1 本のバンドとして認められた。そこで、*Bam*HI で消化したゲノム DNA を用いてライブラリーを作製した。*Bam*HI 消化したゲノム DNA 約 1.5 μ g を λ EMBL3 ファージベクター (Stratagene) 1 μ g にライゲーションし、その反応液 10 μ l のうち 4 μ l をパッケージングした結果、5.0 $\times 10^4$ pfu のライブラリーが得られた。これを 8.0 $\times 10^9$ pfu にまで増幅し、このうち、1.0 $\times 10^5$ pfu についてスクリーニングを行った。プレハイブリダイゼーションは第 2 章に述べた通りに行った。ハイブリダイゼーションは、[α -³²P]dCTP

で標識した pITPCR をプローブに用いて、60℃で一晩行った。ハイブリダイゼーション後、ナイロン膜を 60℃の 1xSSC, 0.1%SDS で 20 分間洗浄し、60℃の 0.1xSSC, 0.1%SDS で 20 分間洗浄した。シグナルの検出は第 2 章に述べた通りに行った。第 2、第 3 スクリーニングの後、3 つのポジティブクローンが得られたが、これらを制限酵素処理により解析した結果、いずれも約 10kb の同一のインサートを持つものであると結論することができたので、このうちの 1 つ (IT3) を *Bam*HI と *Eco*RI で消化し、pBluescript II プラスミドベクター (Stratagene) にサブクローニングしてシーケンシングを行った。

3) PCR (2)

シーケンシングの結果、IT3 には TSH β 遺伝子の 5' 側の部分が含まれていないことが判明したため、残りの部分を得るための PCR を行った。プライマーはウズラ (Kato *et al.*, 1997) ニワトリ (Gregory & Porter, 1997) の TSH β cDNA の 5' 非翻訳領域の塩基配列から設計した TSH-1 と、IT3 の配列から設計した TSH-2 を用いた。

TSH-1: 5'-GAATTCAGCTGACAAGAGGT-3'

TSH-2: 5'-TCAGGCCAAAGAGGAGAGAC-3'

反応は 94℃で 20 秒、68℃で 15 分のサイクルを 30 サイクルとし、One Shot LA PCR Mix (Takara) を用い、ゲノム DNA を鋳型に用いて行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した結果、1kb 付近に 1 本のバンドが見られたため、この DNA を pCR2.1 ベクター (Invitrogen) にライゲーションし、シーケンシングを行った。シーケンシングの後、1 つのクローン (pITPCR2) を選んで後の実験に用いた。

4) ゲノムライブラリーの作製とクローンの単離 (2)

pITPCR2 と IT3 の塩基配列を比較した結果、pITPCR2 は IT3 と重なる部分の配列(約 700bp)とそれよりも上流の配列(約 220bp)からなることがわかったため、この 220bp の配列をプローブに用いてライブラリーのスクリーニングを行った。まず、プローブの作製のために、pITPCR2 を鋳型に TSH-1、TSH-2 をプライマーに用いて PCR を行い、その PCR 産物を *Bam*HI で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離することで目的の 220bp の断片を単離した。この DNA 断片をランダムプライム法により [α - 32 P]dCTP で標識してプローブに用いた。ライブラリーのスクリーニングに先立ち、このプローブを用いてゲノム DNA に対するサザンブロット解析を行った結果、*Bam*HI 消化した DNA のレーンでは約 3kb にシグナルが見られたが、この長さの断片が作製したライブラリーに含まれている可能性は低いため、新たにゲノム DNA を *Sau*3AI で部分消化したライブラリーを作製した。まず、様々な濃度の *Sau*3AI で 1 時間消化したゲノム DNA の一部をアガロースゲル電気泳動し、断片の長さの確認を行った。主に 15kb 以上の長さの DNA 断片を生じているものを選んでアルカリフォスファターゼにより脱リン酸化し、この DNA 約 1 μ g を λ EMBL3 ベクター 1 μ g にライゲーションし、パッケージングした結果、 3.5×10^4 pfu のライブラリーが得られた。このライブラリーを増幅せずにスクリーニングに用いた。プレハイブリダイゼーションの後、上記の約 220bp のプローブを用いて 50 で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、ナイロン膜を 55 の 3xSSC, 0.1% SDS で 20 分間洗浄した後、シグナルの検出を行った。第 2、第 3 スクリーニングの結果、1 つのポジティブクローン (IT7) が得られた。ゲノム DNA に対するサザンブロット解析や IT3 の塩基配列解析などの結果と、このクローンの制限酵素処理の結果を総合して考えた結果、このクローンを制限酵素 *Sal* I 及び *Bgl* II で消化し、約 3.5kb の断片を pBluescript II ファージベクター (Stratagene) にサブクローニン

グしてシーケンシングに用いた。このシーケンシング反応には BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、Applied Biosystems 社製のオートシーケンサーABI PRISM 377 DNA Sequencing System で解析した。

第3節 結果

トキの TSH β 遺伝子の塩基配列を決定するのに用いたシーケンシング戦略を図 4-1 に示した。まず、最初の PCR では、957bp の塩基配列を決定した。この配列をウズラ (Kato *et al.*, 1997) とニワトリ (Gregory & Porter, 1997) の TSH β cDNA の配列と比較した結果、高い相同性を示す部分が見られ、この配列は 739bp のイントロン部分を含むトキの TSH β 遺伝子的一部分であると推定された。この配列をプローブに用いたライブラリーのスクリーニングでは、 1.0×10^5 pfu のクローンより 3 つのポジティブクローンを得ることができた。このうちの 1 つ (IT3) についてシーケンシングを行い、インサートおよそ 10kb のうち、片側からの 1,985bp の塩基配列を決定した。この塩基配列をウズラとニワトリの TSH β cDNA と比較した結果、このクローンには翻訳領域と 3' 非翻訳領域に当たるエクソンは含まれているが、5' 非翻訳領域に相当するエクソンが含まれていないことが判明した。そこで、プライマー TSH-1 と TSH-2 を設計し、PCR を行った結果、923bp の配列を決定することができた。IT3 の配列との比較から、この 923bp の配列のうち 700bp は IT3 と重なる部分であり、残りの 223bp が新たに決定された 5' 側の部分であることが明らかになった。この新たに決定された部分をプローブに用いたゲノムライブラリーのスクリーニングの結果、1 つのポジティブなクローン (IT7) が得られた。このクロ

ーンの一部をサブクローニングしてシーケンシングした結果、3,625bp の塩基配列が決定された。そのうち 1,418bp は IT3 と重なる部分で IT3 の配列と完全に一致しており、さらに 5' 側の 2,207bp がこのクローンにより新たに得られた TSH β 遺伝子の 5' 側の部分であった。

最終的には、IT3 と IT7 で得られた配列を合わせて、4,192bp の塩基配列が決定された。他の鳥類の TSH β cDNA と比較して相同性の高い部分をエクソンと判断することでエクソン-イントロン構造を推定、エクソンとイントロンの境界は gt-ag ルール (Breathnach & Chambon, 1981) に従い決定した。特に転写開始点とポリ A 付加部位は、5' 末端と 3' 末端が RACE (Rapidly Amplified cDNA Ends) 法によって決定されているタイワンアヒル TSH β cDNA (Hsieh *et al.*, 2000) の配列を参考にして推測した。この結果、この配列には 1,937bp の 5' 上流域と、それぞれ 65、163、322bp の 3 つのエクソンと 864、739bp の 2 つのイントロンが含まれていると推定された (図 4-2)。塩基配列よりアミノ酸配列を推定し、ウズラ TSH β サブユニットのものと比較した結果、96.3% という高い相同性が見られたため、この塩基配列はトキ TSH β 遺伝子のものであることが確認された。

推定したエクソン-イントロン構造を既知の魚類、哺乳類のものと比較した (図 4-3)。トキの TSH β 遺伝子は 3 つのエクソンと 2 つのイントロンとからなっており、これはマウスを除く他の動物のエクソン-イントロン構造と同じであった。イントロンの位置もマウスを除く他の動物と同様に、第 1 イントロンは非翻訳領域に、第 2 イントロンは翻訳領域の間に位置していた。翻訳領域の中にある第 2 イントロンの位置をアミノ酸配列のアライメントをとって比較を行った結果 (図 4-4) トキでも魚類、哺乳類のものと同じ位置にあることがわかった。

5' 上流域を他の動物の TSH β 遺伝子と比較した結果、ほとんどの部分では目立った相同性は見られなかったが、プロモーター領域については哺乳類と比較することができた (図

4-5)。この範囲では、哺乳類で Pit-1 responsive element (Steinfelder *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994) AP-1 responsive element (Wondisford *et al.*, 1993) negative thyroid hormone responsive element (nTRE)(Cohen *et al.*, 1995) といった転写調節配列が報告されているが、これらの配列がトキでも保存されていた。また、2 箇所の TATA ボックスも保存されていた。一方、GATA-2 responsive element (Gordon *et al.*, 1997) については、トキでは哺乳類のものから 1 塩基置換していた。

推定したアミノ酸配列を他の鳥類のものと比較した結果 (図 4-6) ウズラと 96.3%、ニワトリと 96.3%、台湾アヒルと 97.8%という高い相同性が見られた。また、システイン残基や糖鎖が付加すると推測されるアスパラギン残基などの特徴的なアミノ酸残基も保存されていることが明らかになった。

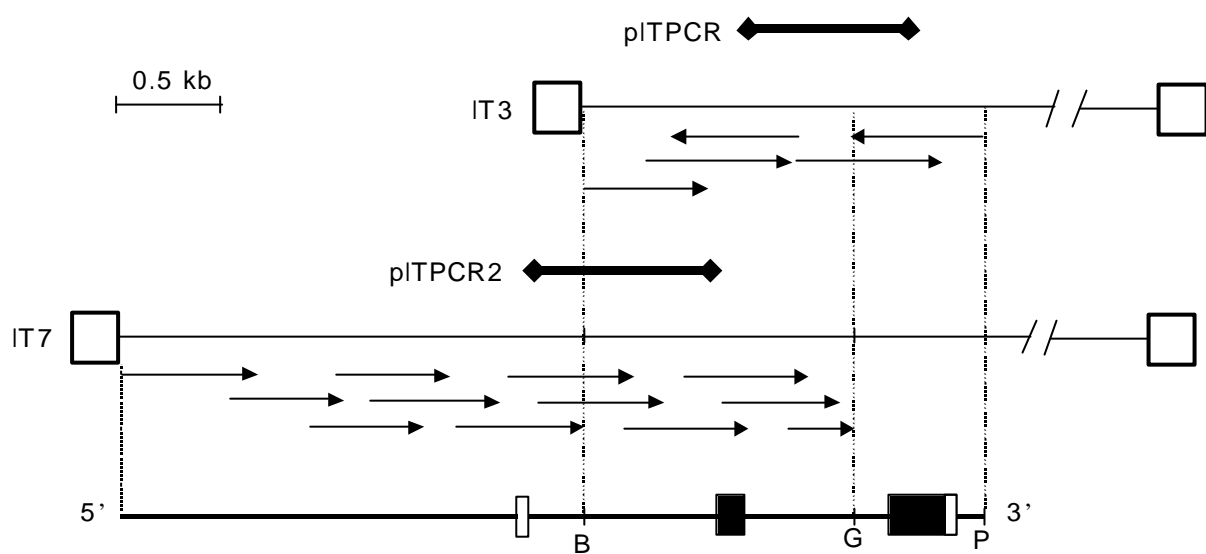


図4-1. トキのTSHβサブユニット遺伝子のエクソン-イントロン構造とシーケンシング戦略

上から順にpITPCR、IT3、pITPCR2、IT7を示した。矢印はシーケンシングの方向と範囲を表す。最下段にはトキTSHβ遺伝子の推測されるエクソン-イントロン構造を示した。ボックスはエクソンを表し、塗りつぶした部分は翻訳領域を、白抜きの部分は非翻訳領域を表す。また、実線部分は5'上流域、イントロン、3'下流域を表す。「B」「P」「G」はそれぞれ制限酵素 *Bam*HI、*Pst*II、*Bgl*IIの認識部位を示す。

gatctgtcctctgcctatatattcttacaggaaacgttgaggacactttaaacctggacgtgggggtcttctctgtcagaacccatgcgtaca
aatacagctcccattgcctaaagctgtgcttgtaaatcactgtgaaatcttttagagaaaagaatcagctgtccctacttcagctatgcat
gcaaggggtcacatgcaatgttcttctgttttaggaatgccatcttttattcttatttttgggcactttctgtcctctccaggatttagtttta
tgaattgtttccttttcttccagcatcgttgtctcctttgaaatactcttaagattttctgtgattaaagttttaaaaaaccaaacc
tacacatatatgtagtgtatagctgtgtatataatgtgtgtgtgtgcgtatatacattatctacatatgggtgtatgtatgtgtatatac
tcataatagcctgtatgtttaaactgcacttaaaatgtgcagaaaaatagagttaaataatgtattggagtagtagcaaaataacagcg
ttatacttctgttgctaaagtgtggatggacagatgttactgagagtcatttaagtctgtcctcatgtccttaagccagaaagagtgtga
tttaattcctgaaaagtatatggtagaaaattaatccataattaaagactccatgaaagcatttggtcagctttaaatagaacaacaactc
tatcatgttatccaaaaaaccccttggggaattagccaggacacagagctgtgtgcagcagcccaaaaccacaggaaaggaggcaatat
tattcaggaattagctaaacaccaatcggaaccgactgggtcactccctcagcagcccaagtgacatgtttaccagctcaaaactcaac
tttatcgtatttcttatggctatgtaaatcaagaacgtgggtgacctgtgtgaagacatacatcagctcagagtcaccaatggccgttgggt
gat taacggaaagggtaggtgctatcaaagctgcagtgaataagcggcgcgaaggctggccgagtgccgaaggtggccgagtgccgaagggc
tggccgagtgccgaagggctggccggccgctgtatgaagcagtagaagacagtggggtttgtgtgaatcagtgcaagacgtgcagtgctgactc
gaccttcttcaatttgcctcctccaggtgttccacaaagccctaaacgtgaagtggttttccctcatcagtggaacatctgggttctact
ggcgttgatgcaatatttctgttctcattgtgtgtacaaggagtggtttcttaaaagattttccctcatcaattagtttcaaagtcaggt
tgcttgttacttcaatatttgcctcggtaggttcaaggccagataatttctcagtggttttgtttgagtggttaagtcaggtgtaccca
accacactgcagagcaattgctttgatttgagatttgctactttctgtgtacagcactgcacatctcagttgtgcctgtcgggtaacgag
caaactgagtgaaaccagcttcattaaacatccgcaaaacataggtgtagaattaagtccttatgtgattcaggatgactccatttccatg
atagccttctctgtcatgtgtgtgtcctaggttagcaattaagttaatcaagagtaacttttttaagcactgggttagtttaaaagcct
gaggagagaatgactgttaaaataattggatttccagctccaggttccaggttaggatattatggacatatattgttctctattgtcatttgc
tttgtgggtcagtatgaattttcaatagatgactttgcgataagaaagacgaattcagatgcaattatataaaacactaaagatcagccag



gaattagcctggagagtataaagcacacacagagcttgtgtcgtgggtcACTGCCTCTCCAGCTCAAGGCAGAGGCAGGTTCTGTAAACAG
GGAAGAATTACAGCTGACAGAGGgttgggtctttccagacttgcattgttgcagctacagggtaaaccagggtctgtaatgaacgggttttg
cgatgggaactgacagctggaagagactagagggtgatgtccatatgtttgtagacactgtcatttagagtttgggttagagggtata
gagtagaccctggaattgtctgggagttaatcaaagcttgggtcgtgggatccccagcaagctcaggaatgaggtcagcacaacagac
agataaagtggggattcattggatttgaactcttctgtgtgttctcattgtaatttgcctgaatctatttatttcttggcagtggt
cccatctcatcagcctctaagccaactggaaagtaaaaaatacagtggtatgcctgatatgcacagctgtttcttttctctcttgaac
attttataagcagctttctttagaaaattattttaaaaccagtgagattattttagcatctctggttaattcttagagctcatgttctctc
acatatgtcacattttcaaactcctttagctcctgttattttctgtgtcagcattttatcactcatttagtgaaaagttccatgtaatatg
ctttagtgggggaaaagtgaatttgtgtatgttcttaattggcctgtttaccctctttttgtttagtggttagtactatttcaattaaa
aagtcgagatttgaaagaatttgcaggtgtagctaaaaagtttaagattacgtctagctgtgactatcataactgttcttgtcaaat
tccgagaaaagggctggaaggtacacctaattttacttaggggttgccttgggttgggttttttcccccatctagC ATG AGT CCC

MET Ser Pro
-20

TTC TTT GTG ATG TCT CTC CTC TTT GGC CTG ACT TTC GGT CAA ACA GCA TCA CTT TGT GCT CCT TCT
Phe Phe Val MET Ser Leu Leu Phe Gly Leu Thr Phe Gly Gln Thr Ala Ser Leu Cys Ala Pro Ser
-10 +1

GAG TAT ATA ATC CAT GTG GAG AAA AGG GAA TGT GCC TAC TGC CTG GCC ATC AAC ACC ACC ATC TGC
Glu Tyr Ile Ile His Val Glu Lys Arg Glu Cys Ala Tyr Cys Leu Ala Ile Asn Thr Thr Ile Cys
+10 +20

GCT GGA TTT TGC ATG ACT CGG gtacaaggcattactctgttttaggcagttgtttctataatggccatcactgcaaaacaagt
Ala Gly Phe Cys MET Thr Arg
+30

Gcctgttctcattggaaaaatgggtgtgtaaatgatccagttctaatactgtttgtcacagaaaaatcacactgtcatgttttcaagtttagc
tttttgcgaaggtatggatgagaaatgccagcctccggaactacggagtttataacaccagtgccacagcagagaactgactgtcgtg
tactgcagggcctctgtagtgcatttgggggtcaggatggaacaggtgagaagcagattatatttagccactcttatttaagtgaac
gacttgggtaacttctactccactactgttacgacagctagctgtggagaatatttgcacataggcatggcaaacactatgcttgagt
ttcgtgttcacacagcatttgaagttccaccttgggtcagtaggttagccaacacagattacaaagcactgttagcactccgagccaagcg
gattagttaaaaccatacaagcaaggtgaacctatctactggggcaagcgccccaatcacaggcagattcaaaatcacagatctgaaca
gaagcgactgaaaatatcagagccaatcaaagtgtaaagaggttgccttctgcacgtttgagacgatgtcaaaagaagtcttctgacg
gtccggtagtgcctccgtgaacaacccatttcttttttctttttag GAC AGC AAT GGC AAG AAG CTG CTA CTC AAA
Asp Ser Asn Gly Lys Lys Leu Leu Leu Lys
+35 +40

AGT GCT CTG TCG CAG AAC GTG TGC ACG TAC AAA GAG ATG TTG TAT CAA ACA GCA CTG ATT CCG GGG
Ser Ala Leu Ser Gln Asn Val Cys Thr Tyr Lys Glu MET Leu Tyr Gln Thr Ala Leu Ile Pro Gly
+50 +60

図4-2. (次ページに続く)

```

TGT CCT CAT CAC ACC ATC CCT TAC TAT TCC TAC CCT GTG GCT GTG AGC TGC AAG TGT GGT AAA TGT
Cys Pro His His Thr Ile Pro Tyr Tyr Ser Tyr Pro Val Ala Val Ser Cys Lys Cys Gly Lys Cys
+70 +80

AAC ACT GAT TAC AGT GAC TGT GTT CAT GAG AAG GTT AGG ACA AAC TAT TGC ACT AAA CCA CAG AAG
Asn Thr Asp Tyr Ser Asp Cys Val His Glu Lys Val Arg Thr Asn Tyr Cys Thr Lys Pro Gln Lys
+90 +100 +110

CTC TGC AAC ATG TAA GCTTCCAACAGAATGTGGCTGAAATGTACCTCTCTGCTGAACTAAACATAAAATAAAAGTGTATTTCATAAC
Leu Cys Asn MET Stop
+114

AGGTTTGCaaattgggtgtgcacaaagttttatttctaaagatgtatcaccagttacttcaattaactgggtattctgtgacacgtgcaaaag
cagaatcgtaggactgcag

```

図4-2. トキのTSHβサブユニット遺伝子の塩基配列

エクソン部分の塩基配列を大文字で、5'上流域、イントロン、3'下流域の塩基配列を小文字で表した。推測される転写開始点を矢印で示し、TATAボックスとポリA付加シグナルには下線を引いた。推測されるアミノ酸配列を塩基配列の下に示し、成熟蛋白質のアミノ末端を+1として順に番号を付けた。

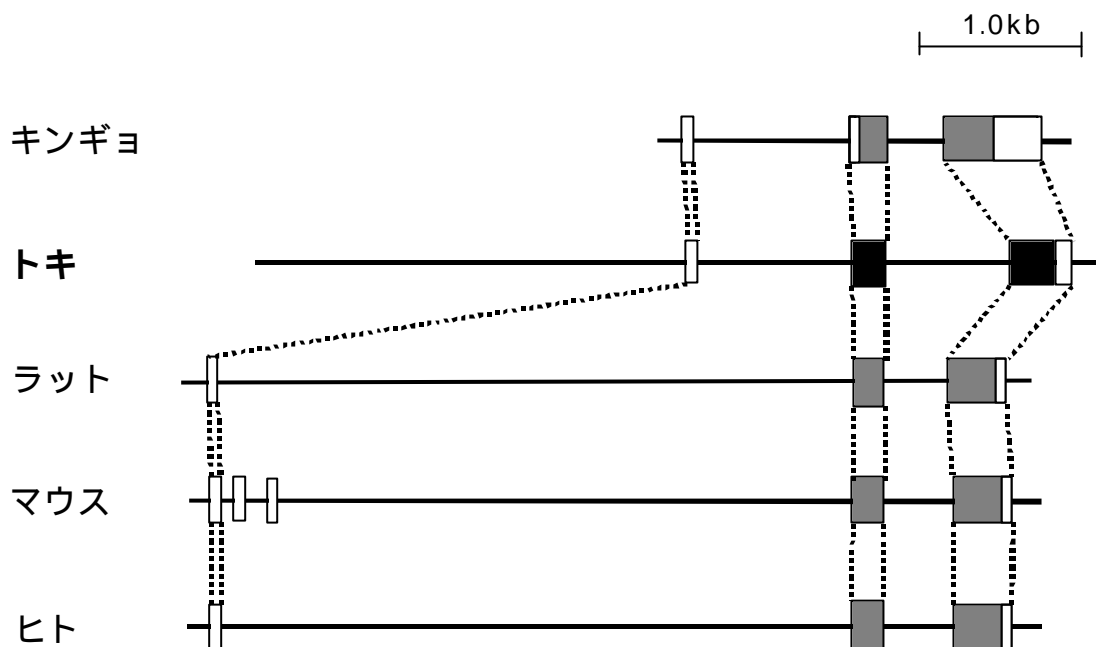


図4-3. キンギョ、トキ、哺乳類のTSH β サブユニット遺伝子のエクソン-イントロン構造の比較

ボックスはエクソンを表し、塗りつぶしの部分は翻訳領域を、白抜きの部分は非翻訳領域を示す。実線部分は5'上流域、イントロン、3'下流域を示す。対応するエクソンを点線で結んだ。

参考文献

キンギョ (Sohn *et al.*, 1999)、ラット (Carr *et al.*, 1987)、マウス (Gordon *et al.*, 1988)、ヒト (Wondisford *et al.*, 1988; Guidon *et al.*, 1988)

	+16		↓		+52
キンギョ	CNYCVAVNTTICMGFCFSR	DSNVKELVGARFLVQRGC			
トキ	CAYCLAINTTICAGFCMTR	DSNGKKLLLKSALSQNVC			
マウス	CAYCLTINTTICAGYCMTR	DINGKLFLLPKYALSQDVC			
ラット	CAYCLTINTTICAGYCMTR	DINGKLFLLPKYALSQDVC			
ヒト	CAYCLTINTTICAGYCMTR	DINGKLFLLPKYALSQDVC			

図4-4. キンギョ、トキ、哺乳類のTSH β サブユニット遺伝子の第2イントロンの位置の比較

矢印とスペースでイントロンの位置を示した。アミノ酸配列の上に示した数字はトキの成熟蛋白質のアミノ末端を+1とした場合のアミノ酸の位置を示す。

参考文献

キンギョ (Sohn *et al.*, 1999)、ラット (Carr *et al.*, 1987)、マウス (Gordon *et al.*, 1988)、ヒト (Wondisford *et al.*, 1988; Guidon *et al.*, 1988)

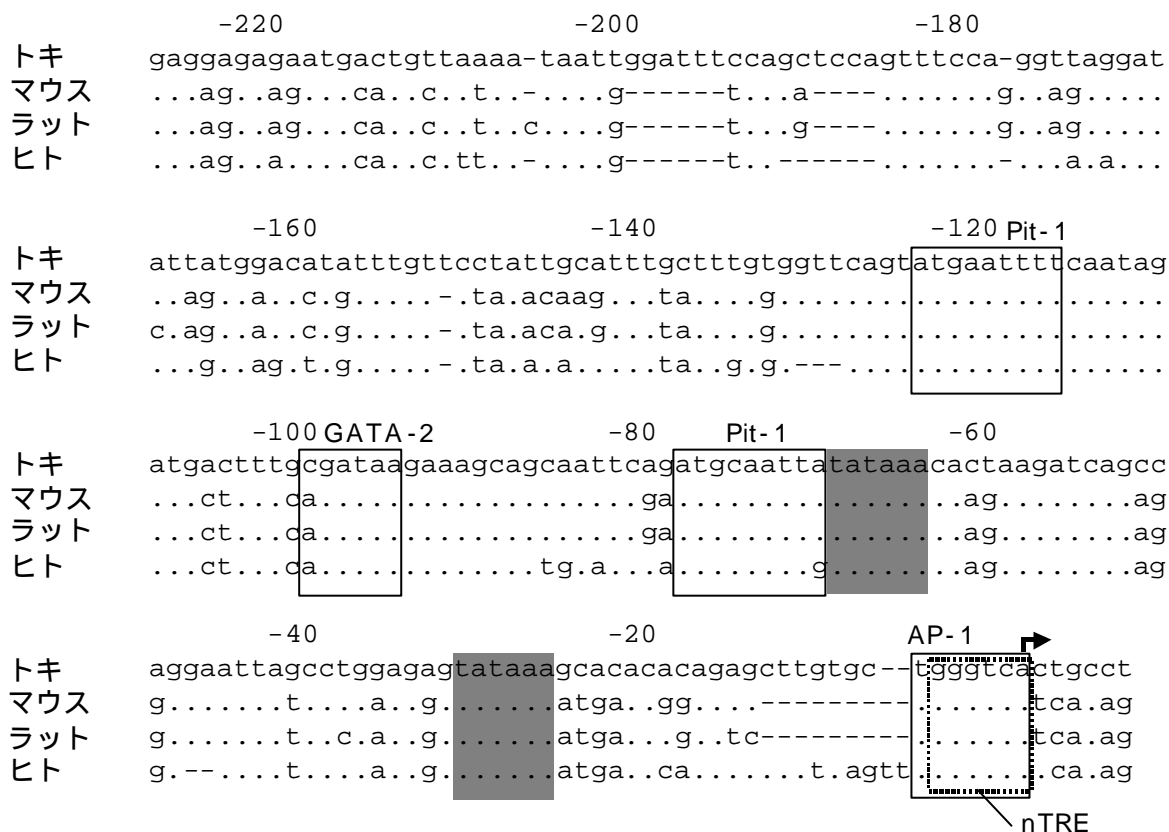


図4-5. トキと哺乳類のTSHβサブユニット遺伝子のプロモーター領域の比較

哺乳類で報告されているPit-1 responsive element (Steinfelder *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1994)、AP-1 responsive element (Wondisford *et al.*, 1993)、GATA-2 responsive element (Gordon *et al.*, 1997)を実線で囲い、negative thyroid hormone responsive element (nTRE) (Cohen *et al.*, 1995)を点線で囲った。また、TATAボックスを網掛けにした。塩基配列の上の数字は、トキのTSHβ遺伝子で推測される転写開始点(矢印)からの位置を示したものである。

参考文献

マウス (Gordon *et al.*, 1988)、ラット (Carr *et al.*, 1987)、ヒト (Guidon *et al.*, 1988)

第4節 考察

本章では鳥類で初めて TSH β 遺伝子の構造を明らかにした。トキ TSH β 遺伝子のエクソン-イントロン構造を他の動物（キンギョ、ラット、マウス、ヒト）と比較した結果、3つのエクソンと2つのイントロンとからなる構造はマウス以外のものと同じであることが明らかになった（図4-3）。マウス TSH β 遺伝子では5つのエクソンと4つのイントロンとからなっているが、これは5'非翻訳領域のエクソンが他のものより2つ多いためである。マウス TSH β 遺伝子の塩基配列をラットやヒトのものと比較すると、その相同性からマウスの第1エクソンが他の動物の第1エクソンに相当し、第2、第3エクソンは他の動物ではイントロンである部分の配列が塩基置換によってエクソンと認識されるように変わったためにマウスのみで生じたものであることがわかる。したがって、この第2、第3エクソンを除けば、マウス TSH β 遺伝子も他の動物のものと同じ構造であるといえる。さらに、マウスも含め、翻訳領域の中にあるイントロンの位置を比較した結果、トキと既知の動物で一致していることが明らかになった（図4-4）。魚類、哺乳類で見られるエクソン-イントロンの基本構造がトキでも保存されていたことから、この構造が他の鳥類でも基本的には保存されているものと考えられる。

5'上流域を他の動物の TSH β 遺伝子と比較した結果、プロモーター領域において、哺乳類で報告されている TATA ボックスや転写調節配列がトキでも見られることが明らかになった（図4-5）。まず、2箇所に見られる TATA ボックスについては、ラットとマウスでは両方が使われ、2箇所から転写が開始されることが報告されている（Carr *et al.*, 1987; Gordon *et al.*, 1988）。一方、ヒトの場合は下流のもののみが使われることが報告されている（Wondisford *et al.*, 1988; Guidon *et al.*, 1988）。本研究では、トキ TSH β 遺伝子の転写開始点を、5'-RACEにより決定されたタイワンアヒル TSH β cDNA（Hsieh *et al.*,

2000)の5'末端の配列を参考にして推定した。この推定とより一致するのは下流の TATA ボックスであるが、上流のものが使われる可能性もあり、この点についてはさらなる研究が必要である。

一般的に TSH の合成、分泌は TSH 放出ホルモン (TSH releasing hormone; TRH) により促進され、甲状腺ホルモンにより抑制される。プロモーター領域の比較では、哺乳類でこれらの調節に関わると報告されている Pit-1 responsive element、AP-1 responsive element、negative thyroid hormone responsive element (nTRE) などの転写調節配列がトキでも保存されていることが明らかになった。Pit-1、AP-1 は哺乳類において TRH による TSH β 遺伝子の発現促進に関わることが報告されている転写調節因子である (Steinfeldt *et al.*, 1992; Wondisford *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1994)。これらの応答配列が保存されていたことから、トキでもこれらの配列を介して TSH β 遺伝子の発現が促進されている可能性がある。ただし、マウス TSH β 遺伝子では、上流の Pit-1 responsive element を介する調節には、近接する部位に GATA-2 という転写調節因子が結合することが必要であると報告されている (Haugen *et al.*, 1996; Gordon *et al.*, 1997)。しかし、トキの GATA-2 responsive element に相当する部分を見ると、1箇所塩基の置換が起こっている。この置換が GATA-2 responsive element としての機能にどのような影響を及ぼすかは不明である。したがって、上流の Pit-1 responsive element が機能するかどうか不明である。

一方、nTRE は甲状腺ホルモンによる TSH β 遺伝子の発現抑制に関わるとされる配列である (Cohen *et al.*, 1995)。トキでもこの配列が保存されていることから、この配列を介しての TSH β 遺伝子の発現の抑制が行われる可能性がある。また、この nTRE は AP-1 responsive element と重なっているが、Wondisford *et al.* (1993) はヒト TSH β 遺伝子で、TRH がこの部位において AP-1 と甲状腺ホルモン受容体の相互作用を引き起こすこ

とにより、この nTRE を介した甲状腺ホルモンによる抑制を緩和する可能性があると報告している。トキ TSH β 遺伝子でもこの nTRE、AP-1 responsive element がともに保存されていることから、哺乳類と同じ転写調節機構が存在する可能性がある。

このように、TSH β 遺伝子の転写調節についてはトキと哺乳類とである程度共通するしくみで行われていることが示唆される。しかし、本研究では塩基配列から推測される可能性を示したに過ぎない。哺乳類ではさらに上流でも転写調節配列が報告されており、トキでもここに示した以外の転写調節配列が存在するものと考えられる。トキ、あるいは鳥類の TSH β サブユニット遺伝子の発現調節の機構を解明するにはさらなる研究が必要である。

鳥類における TSH β サブユニットのアミノ酸配列を比較した結果(図 4-6) これらの鳥類においてはよく保存されていることが明らかになった。古口顎類の鳥類については不明であるが、この結果からは、他の新口顎類の鳥類でも TSH β サブユニットのアミノ酸配列はよく保存されている可能性が高いものと考えられる。

第 5 章

濾胞刺激ホルモン サブユニット 遺伝子の第 2 イントロンの解析

第1節 序

トキ個体間の遺伝的関係を解析することは、この希少種保護の観点から、あるいはこの種の地理的変異を知る上で重要な課題である。これまでトキの個体間の遺伝的関係を調べたものは、電気泳動による PCR 産物のバンドパターンの比較による RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 法だけであり (Han *et al.*, 1999; 佐野&石居, 2001) 塩基配列の変異を明らかにした報告はなかった。一般的に、イントロンの配列は変異が大きいことから、トキの FSH β 遺伝子の第2イントロンについて個体ごとに調べることにした。さらに、トキとの比較を行うため、他の鳥類の同じ部分についても調べた。

第2節 材料及び方法

動物

トキ (*Nipponia nippon*)

日本産 「ミドリ」 1981年に佐渡島で捕獲された個体。

「アオ」 同 上

「シロ」 同 上

中国産 「ロンロン」 1994年9月に来日、12月に日本で死亡。

「ヨウヨウ」 1999年に中国から贈られた個体。

「ヤンヤン」 同 上

「ユウユウ」 「ヤンヤン」「ヨウヨウ」ペアの子。

「シンシン」 同 上

「アイアイ」 同 上

「メイメイ」 2000年に中国から贈られた個体。

「No.1」～

「No.7」 「ユウユウ」「メイメイ」ペアの2001年の子

他のトキ科鳥類（7種）

ブロンズトキ <i>Plegadis ridgwayi</i>	6 個体
クロトキ <i>Threskiornis melanocephalus</i>	4 個体
ショウジョウトキ <i>Eudocimus ruber</i>	7 個体
シロトキ <i>Eudocimus albus</i>	4 個体
ハダダトキ <i>Bostrychia hagedash</i>	2 個体
ホオアカトキ <i>Geronticus eremita</i>	4 個体
ムギワラトキ <i>Threskiornis spinicollis</i>	2 個体

トキ科以外の鳥類（5種）

ハト <i>Columba livia</i>	2 個体
フクロウ <i>Strix uralensis</i>	3 個体
モズ <i>Lanius bucephalus</i>	5 個体
ウズラ <i>Coturnix japonica</i>	2 個体
キウイ <i>Apeteryx mantelli</i>	2 個体

方法

1) ゲノム DNA の抽出

「ミドリ」「ロンロン」については、凍結保存されていた組織 (Ishii, 1999) のうち腎臓の一部 (約 15mg) から、「アオ」「シロ」については、1981 年に採取し凍結保存されていた細胞を培養したものから、「ヤンヤン」「ヨウヨウ」「メイメイ」については血液 (4 μ l) から、「ユウユウ」「シンシン」「アイアイ」「No.1」～「No.7」については卵殻に残っていた組織から、トキ以外の鳥類については血液から、GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてゲノム DNA の抽出を行った。

2) P C R

プライマーは FSH β 遺伝子のクローニングの際と同じ FSH-F と FSH-R を用いた (第 3 章参照)。反応は 95 1 分、50 1 分、72 2 分のサイクルを 30 回とし、Premix Taq (Ex Taq version) (Takara) を用いて行った。

3) シークエンシング

日本産 2 個体 (「ミドリ」「アオ」)、中国産 7 個体 (「ロンロン」「ヨウヨウ」「ヤンヤン」「メイメイ」「ユウユウ」「シンシン」「アイアイ」)、トキ以外の鳥類についてはシークエンシングを行った。得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で確認した後、pCR2.1 プラスミドベクター (Invitrogen) または pCR4-TOPO プラスミドベクター (Invitrogen) にライゲーションした。ライゲーションした DNA をコンピテントセル JM109 (Takara) または TOP10 (Invitrogen) に形質転換し、得られたコロニーからプラスミドを抽出した。シークエンシング反応には Thermo Sequenase Cycle

Sequencing Kit(USB)を用い、LI-COR 社製のオートシーケンサー dNA Sequencer Model 4000L で解析した。

サンプル DNA 量が少なかった「アオ」と、2 型が確認された「ロンロン」と「メイメイ」以外のトキについては PCR 反応を 3 回行い、少なくとも合計 7 クローンについてシーケンシングを行った。

4) *EcoRI* 処理による 2 型の有無の判定

シーケンシングの結果、トキの FSH β 遺伝子のイントロンに 2 種類の配列があることがわかったが、個体内における 2 種類のイントロンの有無の判定を、PCR 産物の *EcoRI* 処理によって行った。上記 PCR 産物を精製後、*EcoRI* 処理し、アガロースゲル電気泳動の後、バンドを確認した。

第3節 結果

まず、日本産 2 個体(「ミドリ」「アオ」)と中国産 7 個体(「ロンロン」「ヨウヨウ」「ヤンヤン」「メイメイ」「ユウユウ」「シンシン」「アイアイ」)について塩基配列を調べた結果、2 種類の配列が存在することが明らかになった(図 5-1)。両者の主な違いは 5' 側の部分における 32bp の配列の有無であり、中国産の「ロンロン」と「メイメイ」からは両方の配列が見つかったが、その他の個体からは短い方の配列しか見つからなかった。長配列と短配列は他にも 3 箇所塩基が置換していた。そのうち最も 3' 側のものでは、短配列における制限酵素 *EcoRI* の認識部位「GAATTC」が、長配列では *EcoRI* に認識されない「CAATTC」に変わっていた。この違いを利用して、各個体における両配列の有無を調べ

た。短配列を含む PCR 産物（約 780bp）は *EcoRI* で切断され、約 550bp と 230bp の断片に分かれるが、長配列を含む PCR 産物（約 810bp）は *EcoRI* では切断されない。日本産の「ミドリ」「アオ」「シロ」、中国産の「ヨウヨウ」「ヤンヤン」「ユウユウ」「シンシン」「アイアイ」の PCR 産物を *EcoRI* 処理した結果、550 と 230bp の断片のみが観察された。すなわち、これらの個体は短配列のみを持つことが確認された。一方、中国産の「ロンロン」と「メイメイ」の PCR 産物を *EcoRI* 処理した結果、約 810、550、230bp の 3 本のバンドが観察され、この 2 個体が長配列と短配列の両方を持つことが確認された。短配列しか持たない「ユウユウ」と両方の配列を持つ「メイメイ」との間に生まれた子（No.1 ~ No.7）は、7 個体中 4 個体が短配列のみを持ち、3 個体が両方の配列を持つことがわかった（図 5-2）。

さらに、他の鳥類の FSH β 遺伝子の第 2 イントロンの塩基配列をシーケンシングしてトキのものと比較した結果（図 5-3）他の鳥類では、32bp の部分に相当する配列が存在するという点でトキの長配列に似た配列のみが見られ、短配列に相当するものは見られないことがわかった。

5' - GTGAGAATCTTAAGTTTAAATTTTCAGGCACCAGAATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAATAACTCATTT
 5' - GTGAGAATCTTAAGTTTAAATTTTC-----TAAATAACTCATTT

CTCCAGTCCTTAATGAACACATAGGCAGGATGAGCCTTGTGAAACAACAGGTTGAGTAACTTCTGTGCT
 CTCCAGTCCTTAATGAACACATAGGCAGGATGAGCCTTGTGAAACAACAGGTTGAGTAACTTCTGTGCT

ATTTGACAGGAAAAGTAGATACACAGCCAGTCTGAACTACAAAGCGAA**A**GGTGAAAAGATGCCAGTAAAA
 ATTTGACAGGAAAAGTAGATACACAGCCAGTCTGAACTACAAAGCGAA**G**GGTGAAAAGATGCCAGTAAAA

TTCAGGTCTTCTTTAACTGGCTGCACACATGTTTATATTGTATAACTAGAGTTGAAAGTAATACAATCT
 TTCAGGTCTTCTTTAACTGGCTGCACACATGTTTATATTGTATAACTAGAGTTGAAAGTAATACAATCT

GGATCTCTGCCTTGTGTTCAATTTGTGGTTGCAAATGGATACAATAAAGCAGCCTTTGTAGACTCCTCT
 GGATCTCTGCCTTGTGTTCAATTTGTGGTTGCAAATGGATACAATAAAGCAGCCTTTGTAGACTCCTCT

ACTTTTCCAAATAATTTGAAGAATC**G**AGTAATTGACCTGAAAGATTGTCTGGTGATGGTATGACACAAA
 ACTTTTCCAAATAATTTGAAGAATC**A**AGTAATTGACCTGAAAGATTGTCTGGTGATGGTATGACACAAA

TTTGCCATATCAGTCCTCCTGAAAGGAGAAATCTAAGGATCTAGGTTAAATTATAAGAGTCTGATGCAA
 TTTGCCATATCAGTCCTCCTGAAAGGAGAAATCTAAGGATCTAGGTTAAATTATAAGAGTCTGATGCAA

ACCCTTTGATCTCAGTGGGATTTTCCCCATTGGTTTAATTAGTTTTTCACATCAGGTCCTTTATTTTGAA
 ACCCTTTGATCTCAGTGGGATTTTCCCCATTGGTTTAATTAGTTTTTCACATCAGGTCCTTTATTTTGAA

AAATTTG**CA**AATTC**T**GCCTCATAACAAATTTCAAAACAAGTATTTCCCTTCTTGTAATTTTCAG-3'
 AAATTTG**GA**AATTC**T**GCCTCATAACAAATTTCAAAACAAGTATTTCCCTTCTTGTAATTTTCAG-3'

図5-1. トキFSHβ遺伝子の第2イントロンで見られた2タイプの塩基配列

上段：長配列、下段：短配列

「-」はギャップを表し、置換のある箇所を「」で示した。短配列では*Eco*RIの認識部位となる部分を実線で囲った。

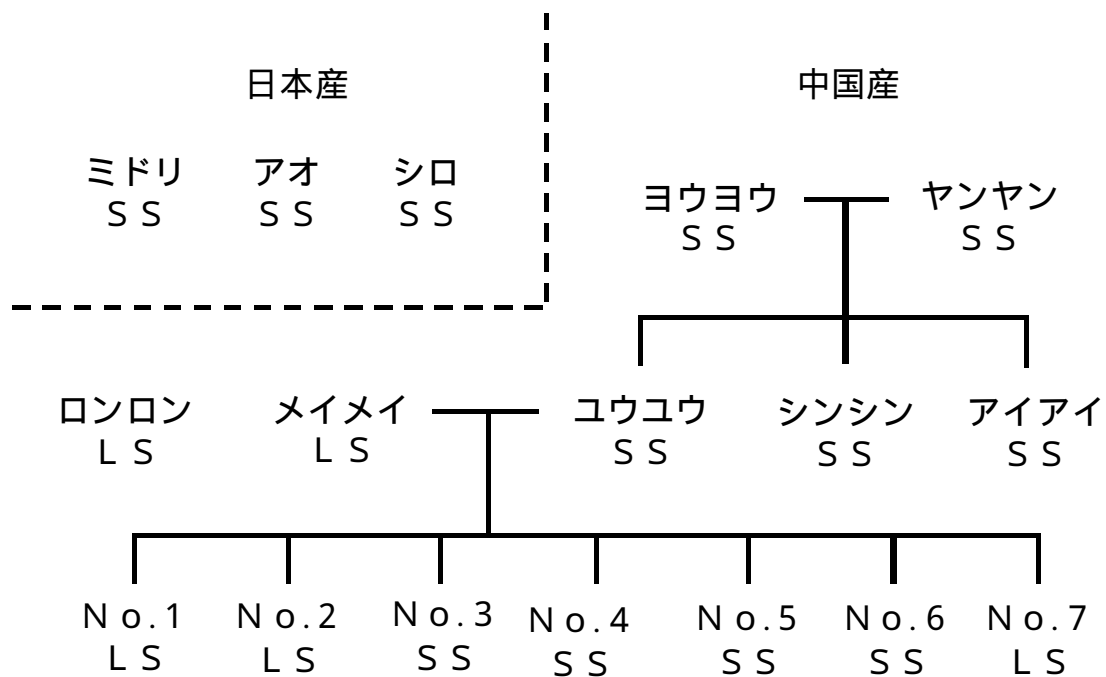


図5-2. トキFSH β 遺伝子の第2イントロンにおける長配列と短配列の有無

「L」は長配列を、「S」は短配列を表し、両方の配列が見られたものを「LS」、短配列のみが見られたものを「SS」と示した。血縁関係のあるものについては系図を示した。

トキ長配列	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT CAGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAAAT
トキ短配列	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT C -----TAAAT
ブロンズトキ	TGAGAATCTTAAGTTT AATTT CAGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGT g TAAAT
クロトキ	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT CAGGtACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAAAT
ショウジョウトキ	TaAGAAcCTTAAGTTT-AATTT CAGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTAT g AAT
シロトキ	TaAGAAcCTTAAGTTT-AATTT CAGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTAT g AAT
ハダダトキ	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT CgGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAAAT
ホオアカトキ	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT CAGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAAAT
ムギワラトキ	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT CgGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAAAT
ハト	TGAGAATCTTAA a TTT-AATTT CAGGCACCAG -AATTAAATATTCCAAGTGATGTATAAAAT
フクロウ	TGAGAATCTTAAGTTT-AATTT CAaGCACCAa -AATTAAATATTCCAAGTGATGTAT g AAT
モズ	TGAGAcTCTTAA-TTT----- CgGGCACgAG -AATTAAATATT t CAAGTGATGCAT g AAT
ウズラ	TGAGAATCTT g AGcTTAA Aa TT CAGGCACCA t-AATT A g g T g TT C -AAGTG Aca TA Tg AAc
キウイ	TGAGAATCTTAAGTTTAA Aa TT CAGG - ACaAGGAATTcAATAcTtCAAGTGtTGTt cgAAT

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

図5-3. トキとその他の鳥類におけるFSHβ遺伝子の第2イントロンの一部の比較

トキで32bpの配列が含まれる5'側の部分についてのみ比較した。トキの長配列と同じ塩基を大文字で、異なる塩基を小文字で表した。また「-」はギャップを表す。最下段の「*」は全ての種で共通の塩基を示す。

第4節 考察

本研究では、トキの FSH β 遺伝子の第2イントロンに長さの異なる2種類の配列が存在することを明らかにした。日本産のトキでは短配列しか見つからなかったのに対し、中国産のトキでは短配列のみを持つ個体と両方の配列を持つ個体の2通りが見られた。今回調べた中国産のトキはいずれも1981年に発見された2つがいに由来するため、この2つがいのうち少なくとも1羽はこの長配列を持っていたことになる。したがって、他の中国産の個体を調べれば、長配列のみを持った個体が見つかる可能性もあると考えられる。また、日本産のトキからは短配列しか見つからなかったが、今回調べた個体「ミドリ」「アオ」「シロ」は、いずれも1981年に佐渡島で同時に捕獲された個体であるため、遺伝的に近縁である可能性がある。このため、他の日本産の個体についても調べることができれば、長配列あるいはそれ以外の配列が見つかる可能性もある。

制限酵素処理による解析の結果、短配列のみを持つ「ユウユウ」と両方の配列を持つ「メイメイ」の子は、短配列を持つものと両方の配列を持つものの割合がほぼ1:1(4個体:3個体)になっていることがわかった。このことは、FSH β 遺伝子が相同染色体上に対で存在し、独立に子孫に受け継がれていることを反映したものであると考えられる。

トキ以外の鳥類について、FSH β 遺伝子の第2イントロンの塩基配列をシーケンシングし、トキのものと比較した結果、他の鳥類ではトキの長配列に相当する配列のみが見られ、短配列に相当する配列は見つからなかった。このことから、トキの短配列はトキという種、あるいはその直接の祖先となった種が確立されてから、32bpの欠損により新たに生じたものであると考えられる。

今後、剥製などを用いて、様々な地域の個体についてこのイントロンの配列を調べることができ、この長配列と短配列の地理的分布を明らかにすることができれば、この種の地

理的分布と遺伝的変異との関係について貴重な情報が得られる可能性があり、興味深い。

第 6 章

総 括

本研究ではまず、トキの脳下垂体糖蛋白質ホルモン共通 α サブユニット遺伝子、濾胞刺激ホルモン β サブユニット (FSH β) 遺伝子、甲状腺刺激ホルモン β サブユニット (TSH β) 遺伝子の 3 つについて、その構造を明らかにした。鳥類でこれらの遺伝子の構造を明らかにしたのは、本研究が最初である。トキのこれらの遺伝子のエクソン-イントロン構造は、共通 α 遺伝子の第 2 イントロンの位置が魚類と異なる点を除いては、エクソンの数、イントロンの位置などにおいて、これまでに報告されている魚類、哺乳類のものと同じであることが明らかになった。このことから、トキで見られるこれらの遺伝子のエクソン-イントロン構造は、基本的にはトキ以外の鳥類でも同じであると考えられる。

鳥類におけるアミノ酸配列の比較では、これまでに明らかにされているものにトキの情報が加わることによって、鳥類における全体的な傾向がつかめるようになった。特に共通 α サブユニットと FSH β サブユニットについてはトキ、キジ目、ダチョウという、鳥類を 3 分する分岐群をそれぞれ代表する種の間でよく保存されていたことから、これらのアミノ酸配列が鳥類全体でよく保存されている可能性が高いと考えられる。したがって、鳥類においては FSH 分子の構造もよく保存されていると考えられる。本研究で得られた結果を元に、トキのリコンビナント FSH を作製することも可能となったが、鳥類においては系統的に遠い種の FSH を投与しても、その種本来の FSH を投与した場合と同じかそれに近い効果が得られるのではないかと考えられる。

残念なことに、本研究では脳下垂体糖蛋白質ホルモンサブユニットの残りの 1 つ、黄体形成ホルモン β サブユニット (LH β) の遺伝子の構造を明らかにすることができなかった。LH β は脳下垂体糖蛋白質ホルモンの他の 3 つのサブユニットよりも進化速度が大きいことが知られているが (Ishii, 1991) 鳥類ではキジ目とダチョウでしかアミノ酸配列が明らかにされていないため、トキの LH β サブユニットのアミノ酸配列を明らかにすることができれば、鳥類における LH β の分子進化を考える上で重要な情報を得ることができると考え

られる。また、生殖腺刺激ホルモン投与による産卵誘起を考えた場合、系統学的に遠い種の LH がどの程度の効果を示すかは未知である。このような観点からも、トキの LH β 遺伝子のクローニングは重要であるが、これは今後に残された課題である。しかし、脊椎動物の生殖を部分的に支配する FSH と、成長と代謝に重要な役割を果たす TSH のサブユニットの遺伝子構造を鳥類で初めて明らかにし、また鳥類内におけるこれらの分子のより一般的な傾向を明らかにしたことは、鳥類におけるこれらのサブユニット分子の研究を大きく前進させたものであると考えられる。

また、トキ FSH β 遺伝子の第 2 イントロンに 2 種類の塩基配列があることを明らかにした。今後、このイントロンについて個体数を増やして調べるとともに、個体間変異について他の遺伝的情報を得ることも重要である。この観点から、現在、トキのミトコンドリア DNA の解析が進行中である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、あらゆる面でご指導、ご鞭撻を下さりました石居進先生には心より感謝いたします。また、最後の1年間、ご指導下さりました東中川徹教授、研究の場を提供して下さい、ご指導、ご助言を下さりました東京都立大学の青塚正志助教授にも深く感謝いたします。そして、研究室に所属して以来、実験のご指導、ご助言を下さりました自治医科大学の菊地元史博士、トキのサンプルの多くを提供して下さいました佐渡トキ保護センターの近辻宏帰センター長、金子良則専門員、卵殻に残った組織からDNAを抽出する方法を提案して下さいました多摩動物公園の杉田平三主任、シグナルペプチド切断部位について助言を下さりました早稲田大学の加藤尚志教授にも心から感謝いたします。そして、様々な面でご協力、励ましをいただきました早稲田大学教育学部生物学教室の皆様、東京都立大学理学研究科生物科学専攻の皆様にもこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Akashi M, Shaw G, Hachiya M, Elstner E, Suzuki G, Koeffler P (1994) Number and location of AUUUA motifs: role in regulating transiently expressed RNAs. *Blood* 83: 3182-3187
- Ando H, Ishii S (1994) Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acids for the pituitary glycoprotein hormone α -subunit and luteinizing hormone β -subunit precursor molecules of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) . *Gen Comp Endocrinol* 93: 357-368
- Arai Y, Kubokawa K, Ishii S, Joss JMP (1998) Cloning of cDNA encoding the common alpha subunit precursor molecule of pituitary glycoprotein hormones in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen Comp Endocrinol* 110: 109-117
- Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann Rev Biochem* 50: 349-383
- Buckbinder L, Brown DD (1993) Expression of the *Xenopus laevis* prolactin and thyrotropin genes during metamorphosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 3820-3824
- Burnside J, Buckland PR, Chin WW (1988) Isolation and characterization of the gene encoding the α -subunit of the rat pituitary glycoprotein hormones. *Gene* 70: 67-74
- Carr FE, Need LR, Chin WW (1987) Isolation and characterization of the rat thyrotropin β -subunit gene, differential regulation of two transcriptional start sites by thyroid hormone. *J Biol Chem* 262: 981-987

- Chen CY, Shyu AB (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20: 465-470
- Chin WW, Muccini JA, Shin L (1985) Evidence for a single rat thyrotropin-beta-subunit gene: Thyroidectomy increases its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 1152-1158
- Cohen O, Flynn TR, Wondisford FE (1995) Ligand-dependent antagonism by retinoid X receptors of inhibitory thyroid hormone response elements. *J Biol Chem* 270: 13899-13905
- Fiddes JC, Goodman HM (1981) The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet* 1: 3-18
- Foster DN, Foster LK (1991) Cloning and sequence analysis of the common α -subunit complementary deoxyribonucleic acid of turkey pituitary glycoprotein hormones. *Poult Sci* 70: 2516-2523
- Foster DN, Galehouse D, Giordano T, Min B, Lamb IC, Porter DA., Intehar KJ, Bacon WL (1992) Nucleotide sequence of the cDNA encoding the common α subunit of the chicken pituitary glycoprotein hormones. *J Mol Endocrinol* 8: 21-27
- Gharib SD, Roy A, Wierman ME, Chin WW (1989) Isolation and characterization of the gene encoding the β -subunit of rat follicle-stimulating hormone. *DNA* 8: 339-349
- Golos TG, Durning M, Fisher JM (1991) Molecular cloning of the rhesus glycoprotein hormone α -subunit gene. *DNA Cell Biol* 10: 367-380
- Goodwin RG, Moncman CL, Rottman FM, Nilson JH (1983) Characterization and

- nucleotide sequence of the gene for the common α subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones. *Nucleic Acids Res* 11:6873-6882
- Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC (1988) Organization and nucleotide sequence of the gene encoding the β -subunit of murine thyrotropin. *DNA* 7: 17-26
- Gordon DF, Lewis SR, Haugen BR, James RA, McDermott MT, Wood WM, Ridgway EC (1997) Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin β -subunit promoter. *J Biol Chem* 272: 24339-24347
- Gordon DF, Wood WM, Ridgway EC (1988) Organization and nucleotide sequence of the mouse α -subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA* 7: 679-690
- Gregory CC, Porter TE (1997) Cloning and sequence analysis of a cDNA for the β subunit of chicken thyroid-stimulating hormone. *Gen Comp Endocrinol* 107: 182-190
- Guidon PT Jr., Whitfield GK, Porti D, Kourides IA (1988) The human thyrotropin β -subunit gene differs in 5' structure from murine TSH- β genes. *DNA* 7: 691-699
- Gurr JA, Catterall JF, Kourides IA (1983) Cloning cDNA encoding the pre-beta subunit of mouse thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2122-2126
- Guzman K, Miller CD, Phillips CL, Miller WL (1991) The gene encoding ovine follicle-stimulating hormone β : Isolation, characterization, and comparison to a related ovine genomic sequence. *DNA Cell Biol.* 10: 593-601
- Han Z, Li F, Liu Y, Liu B (1999) Detection of intraspecific genetic relationship in crested ibises *Nipponia nippon* through random amplified polymorphic DNA

analysis.

- Haugen BR, McDermott MT, Gordon DF, Rupp CL, Wood WM, Ridgeway EC (1996) Determinants of thyrotrope-specific thyrotropin β promoter activation. *J Biol Chem* 271: 385-389
- Hirai T, Takigawa H, Kato Y (1990) The gene for the β subunit of porcine FSH: absence of consensus oestrogen-responsive element and presence of retroposons. *J Mol Endocrinol* 5: 147-158
- Hsieh YL, Chatterjee A, Chien JT, Yu JYL (2001) Molecular cloning of the cDNAs for pituitary glycoprotein hormone α subunits of two species of duck and their gene regulation. *J Mol Endocrinol* 27: 339-347
- Hsieh YL, Chatterjee A, Lee G, Yu JYL (2000) Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for thyroid-stimulating hormone β subunit of Muscovy duck. *Gen Comp Endocrinol* 120: 336-344
- Huang CJ, Huang FL, Wang YC, Chang YS, Lo TB (1992) Organization and nucleotide sequence of carp gonadotropin α subunit genes. *Biochim Biophys Acta* 1129: 239-242
- Huang HJ, Sebastian J, Strahl BD, Wu JC, Miller WL (2001) Transcriptional regulation of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene by activin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) : Involvement of two proximal activator protein-1 sites for GnRH stimulation. *Endocrinology* 142:2267-2274
- Ishii S (1991) Gonadotropins. In "Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications Vol 4 Part B" Eds by PKT Pang and MP Schreibman,

- Academic Press, New York, pp 33-66
- Ishii S (1999) Application of modern endocrine methods to conservation biology.
Ostrich 70: 33-38
- Ito M, Koide Y, Takamatsu N, Kawauchi H, Shiba T (1993) cDNA cloning of the beta subunit of teleost thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6052-6055
- Jameson JL, Becker CB, Lindell CM, Habener JF (1988) Human follicle-stimulating hormone β -subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 2: 806-815
- Kato Y, Ezashi T, Hirai T, Kato T (1990) The gene for the common α subunit of porcine pituitary glycoprotein hormone. *J. Mol. Endocrinol.* 7: 27-34
- Kato Y, Kato T, Tomizawa K, Iwasawa A (1997) Molecular cloning of quail thyroid-stimulating hormone (TSH) β subunit. *Endocrine J* 44: 837-840
- Kikuchi M, Kobayashi M, Ito T, Kato Y, Ishii S (1998) Cloning of complementary deoxyribonucleic acid for the follicle-stimulating hormone- β subunit in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol* 111: 376-385
- Kim KE, Gordon DF, and Maurer RA (1988) Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone β -subunit. *DNA* 7: 227-233
- Koide Y, Papkoff H, Kawauchi H (1996) Complete amino acid sequences of follitropin and lutropin in the ostrich, *Struthio camelus*. *Eur J Biochem* 240: 262-267
- Kumar TR, Kelly M, Mortrud M, Low MJ, Matzuk MM (1995) Cloning of the mouse gonadotropin β -subunit-encoding genes, I. Structure of the follicle-stimulating hormone β -subunit-encoding gene. *Gene* 166: 333-334

- Lin SC, Li S, Drolet DW, Rosenfeld MG (1994) Pituitary ontogeny of the Snell dwarf mouse reveals Pit-1-independent and Pit-1-dependent origins of the thyrotrope. *Development* 120: 515-522
- Maurer RA, Croyle ML, Donelson JH (1984) The sequence of a cloned cDNA for the beta subunit of bovine thyrotropin predicts a protein containing both NH₂- and COOH-terminal extensions. *J Biol Chem* 259: 5024-5027
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10: 1-6
- Nielsen H, Krogh A (1998) Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceeding of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, pp122-130
- Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Gur G, Melamed P, Meiri I, Yaron Z, Elizur A (2001) Characterization of tilapia FSH β gene and analysis of its 5' flanking region. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 389-398
- Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667
- Shen ST, Yu JYL (2002) Cloning and gene expression of a cDNA for the chicken follicle-stimulating hormone (FSH)- β -subunit. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 375-386
- Sohn YC, Suetake H, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K (1998) Structural and

- expression analyses of gonadotropin β subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*) . *Gene* 222: 257-267
- Sohn YC, Yoshiura Y, Suetake H, Kobayashi M, Aida K (1999) Isolation and characterization of the goldfish thyrotropin β subunit gene including the 5'-flanking region. *Gen Comp Endocrinol* 115: 463-473
- Steinfelder HJ, Radovick S, Wondisford FE (1992) Hormonal regulation of the thyrotropin β -subunit gene by phosphorylation of the pituitary-specific transcription factor Pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5942-5945
- Suzuki K, Liu D, Hew CL(1995) A gene encoding chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotropin α subunit: gene structure and promoter analysis in primary pituitary cells. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4: 10-19
- Wakabayashi S, Kikuchi M, Wada M, Sakai H, Ishii S(1992) Induction of ovarian growth and ovulation by administration of a chicken gonadotrophin preparation to Japanese quail kept under a short-day regimen. *Brit Poultry Sci* 33: 847-858
- Webster JC, Pedersen NR, Edwards DP, Beck CA, Miller WL (1995) The 5'-flanking region of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene contains six progesterone response elements: Three proximal elements are sufficient to increase transcription in the presence of progesterone. *Endocrinology* 136: 1049-1058
- Wondisford FE, Radovick S, Moates JM, Usala SJ, Weintraub BD(1988) Isolation and characterization of the human thyrotropin β -subunit gene. *J Biol Chem* 263: 12538-12542

Wondisford FE, Steinfelder HJ, Nations M, Radovick S (1993) AP-1 antagonizes thyroid hormone receptor action on the thyrotropin β -subunit gene. *J Biol Chem* 268: 2749-54

新井雄太 (1999 年) 博士論文「脊椎動物における脳下垂体糖タンパク質ホルモン α サブユニットの分子構造と進化」 早稲田大学理工学研究科

佐野美里、石居進 (2001 年) トキ科鳥類 8 種における RAPD 解析による種間および種内の遺伝的関係の研究 第 26 回鳥類内分泌研究会

安田健 (1983 年) トキ 黄昏に消えた飛翔の詩 (山階芳麿、中西悟堂監修), pp250-269, 教育社

由利たまき (2002 年) 「これからの鳥類学」(山岸哲、樋口広芳共編), pp322-356, 裳華房

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月日、 連名者
論文 (報文)	<p>Cloning of the genes for the pituitary glycoprotein hormone α and follicle-stimulating hormone β subunits in the Japanese crested ibis, <i>Nipponia nippon</i>. <i>Zoological Science</i> 20(4) 掲載決定 Daisuke Kawasaki, Tadashi Aotsuka, Toru Higashinakagawa, and Susumu Ishii</p> <p>Cloning of the gene for the thyrotropin β subunit in the Japanese crested ibis, <i>Nipponia nippon</i>. <i>Zoological Science</i> 20(2) 掲載決定 Daisuke Kawasaki, Tadashi Aotsuka, Toru Higashinakagawa, and Susumu Ishii</p>
講演 (国際学会)	<p>Analysis of partial nucleotide sequences of the genes for the pituitary glycoprotein hormone subunits in the Japanese crested ibis, <i>Nipponia nippon</i> 14th International Congress of Comparative Endocrinology (Napoli) 2001.5 D. Kawasaki and S. Ishii</p> <p>Cloning of the genes for the follicle-stimulating hormone-β and thyroid-stimulating hormone-β subunit precursors in the Japanese crested ibis 4th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (Taipei) 2000.5 Daisuke Kawasaki, Motoshi Kikuchi, and Susumu Ishii</p> <p>Application of techniques in molecular and cellular biology to conservation of endangered birds 4th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (Taipei) 2000.5 M. Kikuchi, D. Kawasaki and S. Ishii</p>
講演	<p>トキの甲状腺刺激ホルモン サブユニット遺伝子のクローニング 鳥類内分泌研究会 第27回大会 (佐渡) 2002.7 河崎大輔、青塚正志、東中川徹、石居進</p> <p>トキの濾胞刺激ホルモン サブユニット遺伝子のイントロンの解析 鳥類内分泌研究会 第26回大会 (知念村) 2001.11 金井もえ子、河崎大輔、石居進</p>

研 究 業 績

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月日、 連名者
講演	<p>トキの脳下垂体糖蛋白質ホルモン共通 サブユニット遺伝子のクローニング 鳥類内分泌研究会 第25回大会 (鴨川) 2000.11 河崎大輔、菊地元史、石居進</p> <p>トキの濾胞刺激ホルモン サブユニット遺伝子の部分的な塩基配列の解析 鳥類内分泌研究会 第24回大会 (高知) 1999.11 河崎大輔、菊地元史、石居進</p> <p>トキの濾胞刺激ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン サブユニット遺伝子の部分的な塩基配列の解析 下垂体研究会 第14回学術集会 (自治医大) 1999.8 河崎大輔、菊地元史、石居進</p>